

Université de Montréal

Étude de l'effet d'un mimétique de l'apoA-I sur la dysfonction diastolique du ventricule gauche

par Walid Nachar

Programme de Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Sciences biomédicales
option générale

Mai 2019

© Walid Nachar, 2019

Résumé

La dysfonction diastolique du ventricule gauche (LVDD), une forme d'insuffisance cardiaque, est une maladie qui affecte la compliance du myocarde. Contrairement à l'insuffisance cardiaque systolique, aucun traitement contre cette pathologie n'est approuvé à ce jour en clinique. L'absence d'un traitement efficace est liée à la complexité des mécanismes responsables du développement de la LVDD ainsi qu'au petit nombre de modèles animaux reflétant sa physio-pathologie. Dans notre laboratoire, nous avons démontré qu'un mimétique de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I), composante majeure des lipoprotéines de haute densité (HDL), améliore la LVDD dans un modèle de sténose valvulaire aortique (SVA) chez le lapin. La SVA peut causer une LVDD. Le premier objectif de cette thèse fut de développer un modèle animal de LVDD sans SVA. Le deuxième objectif fut de tester les effets potentiels de l'apoA-I sur cette pathologie et d'élucider les mécanismes d'action impliqués dans ces effets.

Pour ce faire, nous avons utilisé deux différents modèles expérimentaux chez le lapin. Le premier était basé sur l'exposition des lapins à une diète riche en cholestérol pendant une période moyenne de 16 semaines (sans excès de vitamine D2 afin de ne pas causer de développement de SVA). Le deuxième est un modèle chirurgical de constriction au niveau aortique (TAC) où les lapins développent la LVDD dans un délai de moins de 12 semaines suivant la chirurgie sans l'implication de la valve aortique. Nous avons par la suite traité ces lapins à l'aide d'un mimétique de l'apoA-I pour une durée de 4 semaines à raison de 3 injections de 25 mg/kg par semaine. Des sessions d'échocardiographies ont été réalisées afin d'évaluer le stade de la maladie à différents moments de l'étude. Les effets du traitement sur le plan moléculaire ont été évalués par des expériences de qPCR et d'immunohistochimie. Dans nos deux modèles de lapins, nous avons réussi à induire une LVDD sans la présence de SVA. À la fin de la période de traitement, notre médicament n'a pas amélioré significativement la LVDD chez les lapins. Seuls quelques effets positifs modestes du traitement au niveau de l'inflammation ont toutefois été remarqués.

Ces résultats nous ont permis de déterminer que les effets positifs sur la LVDD des mimétiques de l'apoA-I que nous avons précédemment vus dans une étude antérieure ne sont

pas directement liés à des bénéfices au niveau du myocarde mais qu'ils sont plutôt médiés par l'amélioration de la SVA.

Mots-clés : Dysfonction diastolique, sténose valvulaire aortique, apoA-I, modèle animal.

Abstract

Left ventricular diastolic dysfunction (LVDD), a precursor form of heart failure, is a condition that affects compliance and relaxation of the myocardium. Unlike systolic heart failure, there is no clinically approved treatment yet for LVDD. Complexity of the pathways behind this disease as well as the small number of adequate animal models reflecting its physiopathology are the main causes of this lack of treatment. In our laboratory, we previously showed that mimetic of apolipoprotein A-I (apoA-I), a major component of high-density lipoproteins (HDL), improves LVDD in a rabbit model of aortic valve stenosis (AVS). AVS is one of the main risk factors which can cause LVDD. The first objective of this thesis is to develop a valid animal model of LVDD without AVS. The second objective is to test the potential effects of apoA-I on this pathology and to elucidate the mechanisms of action behind these effects.

To do so, we used two different models of rabbits. The first, was based on the exposure of rabbits to a high-cholesterol diet for an average period of 16 weeks (without excess of vitamin D2 to prevent development of AVS). The second, is a surgical model of transaortic constriction (TAC). With this model, rabbits develop LVDD within 12 weeks after surgery, without involvement of AVS. Once LVDD was established, rabbits were treated with 3 injections of 25 mg/kg of apoA-I mimetic peptide weekly for 4 consecutive weeks. Echocardiography sessions were performed throughout the study to assess the stage of the disease at different time points. Molecular effects of the treatment were evaluated by qPCR and by immunohistochemistry experiments. In our two rabbit models, LVDD was established without the presence of AVS. At the end of the treatment period, our drug did not significantly improve diastolic dysfunction in rabbits. Only a few positive effects of treatment involved in the anti-inflammatory pathway have been noticed.

In conclusion, these results allowed us to confirm that the positive effects of apoA-I mimetic peptide that we have previously reported on LVDD in another study were mediated by the improvement of AVS but not by a direct effect on the myocardium.

Keywords: Left ventricular diastolic dysfunction, aortic valve stenosis, apoA-I, animal model.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xi
Remerciements.....	xvi
Chapitre I : Introduction	1
1. Les maladies cardiovasculaires	1
1.1 Les facteurs de risque	3
1.1.1 Les facteurs de risque contrôlables	3
1.1.2 Les facteurs de risque non-contrôlables	4
1.2 L'insuffisance cardiaque	4
1.2.1 L'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée (ICFEP)	5
1.2.2 Les facteurs de risque de l'ICFEP	6
1.2.3 Les symptômes	6
1.2.4. Diagnostic.....	6
1.2.5 Échocardiographie	7
1.2.5.1 Principes et paramètres de mesure de la DD	7
1.2.5.2 Limitations de l'échocardiographie par la composante Doppler 2D dans l'évaluation de la DD.....	9
1.2.5.3 Nouvelles modalités de mesures échocardiographiques dans l'évaluation de la DD.	10
1.2.6 Les niveaux de peptides natriurétiques dans le diagnostic de l'ICFEP	11
1.2.7 Le cathétérisme.....	11
1.2.8 Physiopathologie de l'ICFEP	12
1.2.9 Mécanismes impliqués dans la DD.....	14

1.2.9.1 L'homéostasie calcique	14
1.2.9.2 Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAA)	15
1.2.9.3 Les peptides natriurétiques	16
1.2.9.4 Le stress oxydatif	18
1.2.9.5. L'inflammation	18
1.2.9.6 Les maladies coronariennes dans la DD	21
1.2.9.7 La titine.....	21
2. Traitements contre l'ICFEP	23
2.1 Hypertension artérielle.....	23
2.1.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA).....	24
2.1.2 Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA)	24
2.1.3 Les antagonistes de l'aldostérone	25
2.1.4 Les diurétiques.....	25
2.1.5 Les inhibiteurs de la néprilysine	26
2.1.6 Les β -bloqueurs	26
2.2 Ivabradine	26
2.3 Les statines.....	27
2.4 Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les mimétiques de l'apoA-I.....	28
2.4.1 La structure et les sous-classes de HDL.....	28
2.4.2 Les principaux composants des HDL	29
2.4.2.1 Les apolipoprotéines (Apo)	29
2.4.2.2 Les enzymes	30
2.4.2.3 Protéines de transfert de lipides	30
2.4.2.4 Protéines diverses.....	31
2.4.2.5 Les lipides :.....	31
2.4.3 La formation de la plaque et le rôle des lipoprotéines dans le transport du cholestérol	32
2.4.4 Les effets anti-inflammatoires des HDL	34
2.4.5 Les effets anti-oxydants des HDL	34
2.4.5 Les différentes stratégies d'augmentation des niveaux des HDL	35

2.4.5.1 Les habitudes de vie :	35
2.4.5.2 La modification génétique	36
2.4.5.3 Les médicaments pharmacologiques.....	36
2.4.5.4 Les mimétiques des apolipoprotéines :	38
2.4.6 Les HDL et leurs mimétiques dans la DD	39
3. But principal et objectifs de la thèse	43
Chapitre II: Cardiac inflammation and diastolic dysfunction in hypercholesterolemic rabbits	44
Chapitre III: ApoA-I mimetic peptide does not improve left ventricular diastolic dysfunction in rabbits without aortic valve stenosis	79
Chapitre IV: Discussion	116
Limitations et perspectives	126
Bibliographie	128
Annexe I: Diastolic dysfunction: assessment, mechanisms and experimental models.....	150

Liste des tableaux

Tableau I.	Différents peptides mimétiques des apolipoprotéines. Modifié de [191].	38
Tableau II.	Modèles animaux de dysfonction diastolique expérimentale, leurs forces et leurs faiblesses classifiés selon le facteur de risque approprié.	41
Tableau III.	Modèles animaux de la DD, leurs forces et leurs faiblesses selon l'espèce.....	42

Liste des figures

Figure 1.	Le système rénine-angiotensine-aldostérone et son implication dans la vasoconstriction et l'augmentation de la tension artérielle. Tirée de [97]	16
Figure 2.	Structure des peptides natriurétiques humains. Les acides aminés conservés dans les différents peptides sont en bleu. Adaptée de [100].....	17
Figure 3.	La titine dans un sarcomère ainsi que ses différents isoformes cardiaques. Adaptée de [130]	22
Figure 4.	Schéma simplifié du transport inverse du cholestérol. Tiré de [191]	33

Liste des abréviations

2D: deux dimensions

a.a: acide aminé

A-Ar: L'onde A moins la régurgitation de l'onde A

ACC: american college of cardiology, collège américain de cardiologie

ACE: enzyme de conversion de l'angiotensinogène

ADCY9: adénylate cyclase de type 9

AHA: american heart association, association américaine du cœur

ALT: alanine transaminase

AngII: angiotensine II

ANP: peptide natriurétique auriculaire ou de type A

apoA-I: apolipoprotéine A-I

Ar: régurgitation de l'onde A ou onde A retrograde

ARA: antagonistes du récepteur à l'angiotensine

ARBs: bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine

ARNm: acide ribonucléique messenger

AST: aspartate transaminase

AT-1R: récepteur de type 1 de l'angiotensine II

AT-2R: récepteur de type 2 de l'angiotensine II

ATP: adénosine triphosphate

AVS: aortic valve stenosis, sténose valvulaire aortique

BNP: peptide natriurétique cérébral ou de type B

CAMK: calmoduline-kinase

CETP: protéine de transfert des esters de cholestérol

CNP: peptide natriurétique de type C

CRP: protéine C-réactive

DD: dysfonction diastolique

DHE: dihydroxyéthidium

Domaine PEVK: domaine riche en proline, acide glutamique, valine et lysine

DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

Échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: échangeur membranaire sodium/calcium
 EF: fraction d'éjection
 eNOS: synthase endothéliale de l'oxyde nitrique
 EPC: cellule endothéliale progénitrice
 ESC: société européenne de cardiologie
 ETO: échocardiographie transoesophagienne
 ETT: échocardiographie transthoracique
 FH: hypercholestérolémie familiale
 H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
 HDL: high-density lipoproteins/ lipoprotéine de haute densité
 HMG: hydroxyméthylglutaryl
 HUVEC: cellules endothéliales des veines ombilicales humaines
 IC: insuffisance cardiaque
 ICAM: intercellular Adhesion Molecule, molécule d'adhésion intercellulaire
 iCETP: inhibiteur de la CETP
 ICFEP: insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée
 ICFER: insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite
 iECA: inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
 Ig: immunoglobuline
 IL: interleukine
 IP: voie intrapéritonéale
 IV: voie intraveineuse
 IVRT: temps de relaxation isovolumique
 J-DHF: japanese diastolic heart failure study
 Kinase ERK: extracellular signal-regulated kinase
 LCAT: lécithine/cholesterol acyltransférase
 LDL: low density lipoprotein, lipoprotéine de basse densité
 LDL-R: récepteur des LDL
 Lp-a: lipoprotéine (a)
 LpPLA2: lipoprotéines associées à la phospholipase A2
 LPS: lipopolysaccharides

LVDD: Left ventricular diastolic dysfunction/ dysfonction diastolique du ventricule gauche
 LVEDP: pression télédiastolique au niveau du ventricule gauche
 LVEDV: volume télédiastolique au niveau du ventricule gauche
 M0: macrophages non polarisés
 M1: macrophages ‘‘pro-inflammatoires’’ de type 1
 M2: macrophages ‘‘anti-inflammatoires’’ de type 2
 MCV: maladie cardiovasculaire
 NEP: ectoenzyme neutre endopeptidase
 NO: oxyde nitrique
 NPR-A: récepteur du peptide natriurétique A
 NPR-B: récepteur du peptide natriurétique B
 NPR-C: récepteur du peptide natriurétique C
 NT: N-terminal
 OG: oreillette gauche
 P2Y₁₃R: récepteur purinergique
 PAF: facteur d’activation de plaquettes
 PK: Protéine Kinase
 PLB: phospholamban
 P_{max}: pression maximale
 P_{min}: pression minimale
 PON: paraoxonase
 RAA: rénine-angiotensine-aldostérone
 RAAS: système rénine-angiotensine-aldostérone
 RCT: transport inverse du cholestérol
 ROS: radicaux libres
 RS: réticulum sarcoplasmique
 RYR2: récepteur à la ryanodine
 SERCA2: pompes sarco/endoplasmique du calcium
 SOD2: superoxide dismutase de type 2
 SR-B1: récepteurs scavengers de la classe B1
 SV: volume d’éjection systolique

SVA: sténose valvulaire aortique

TAC: transaortic constriction, constriction transaortique

Tgf- β 1: facteur de croissance transformant de type bêta 1

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale de type alpha 1

VCAM: vascular cell adhesion molecule, molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

VG: ventricule gauche

*À mes parents et ma conjointe qui étaient présents pour m'appuyer et m'encourager pendant
toute la période de mes études.*

Remerciements

En premier, je tiens à remercier mon superviseur, le Docteur Éric Rhéaume, qui était présent pendant toutes les étapes de mon doctorat pour m'appuyer et me garder sur le bon chemin du projet. Son intelligence, sa patience et ses conseils m'ont permis d'achever ce travail avec un plus grand esprit scientifique. Également, je remercie mon directeur de recherche, le Docteur Jean-Claude Tardif, pour sa passion et son expérience en recherche ainsi que pour son soutien et son aide à la réalisation de cette étude.

Un grand merci pour l'ensemble des membres du laboratoire pour leur encouragement au cours de mon doctorat et plus particulièrement pour Foued, Téodora, Mélanie, Nolwenn, Geneviève et Gabriel pour leur aide et leur implication directe dans le projet.

Et les plus grands remerciements vont à mes parents, ma femme Nada, mes sœurs Abir, Nadine et Nissrine pour leur grand appui et leur soutien extraordinaire.

Chapitre I : Introduction

1. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des causes principales de décès dans les pays développés. En effet, au Canada, plus de 100 milles de personnes âgées de plus de 20 ans souffrent d'une maladie cardiovasculaire. Ces maladies peuvent être classifiées sous différentes grandes catégories distinctes :

- La cardiopathie ischémique est le type le plus courant de maladies cardiovasculaires. Elle fait référence à des problèmes causés par le blocage partiel ou total d'une ou de plusieurs artères coronaires induisant ainsi une ischémie du muscle cardiaque causée par le manque d'oxygène au niveau du tissu cardiaque [1]. Parmi les principaux symptômes de ce type d'ischémie, nous notons l'essoufflement (dyspnée) et l'angine de poitrine.
- La maladie vasculo-cérébrale fait référence à un manque de circulation de sang au niveau du cerveau causé par le blocage partiel de la carotide ou des vaisseaux sanguins cérébraux. Une ischémie transitoire est limitée par un blocage de moins de 24 heures. Lorsque le blocage est complet et à long terme, nous parlerons d'un accident vasculo-cérébrale thrombotique [2].
- L'insuffisance cardiaque représente un type de maladie cardiovasculaire qui ne cesse de croître. En effet, une atteinte au niveau du cœur empêche le pompage adéquat du sang vers le reste des tissus du corps. Les personnes atteintes de cette maladie souffrent généralement d'un essoufflement et d'œdème au niveau des poumons et des membres inférieurs [3]. Nous élaborerons plus en détails les différentes formes d'insuffisance cardiaque dans les prochaines sections de cette thèse.
- Les arythmies cardiaques sont des pathologies touchant le rythme et les circuits électriques du cœur. Une augmentation de la fréquence cardiaque est nommée tachycardie (plus de 100 battements par minute) alors qu'un ralentissement de la fréquence cardiaque est nommée bradycardie (moins de 60 battements par minute). Les

tachycardies ont soit un rythme régulier (ex : tachycardie sinusale) ou bien un rythme irrégulier tel que la fibrillation auriculaire. Les arythmies peuvent être causé par des problèmes de formation et / ou de conduction de pulsations électriques [4]. Dans une physiologie normale, la dépolarisation du nœud sinusal situé au niveau de l'oreillette droite génère un potentiel d'action qui engendre par une contraction du muscle cardiaque [5]. Dans la fibrillation auriculaire, un nombre de dépolarisations irrégulières et rapides des oreillettes cause des battements irréguliers des ventricules.

- Les valvulopathies sont des maladies qui touchent les valves cardiaques, principalement la valve aortique et la valve mitrale. Une valve dysfonctionnelle ne s'ouvre pas correctement (dans le cas d'une sténose par exemple) ou bien ne se referme pas complètement (régurgitation) [6]. Lors d'une sténose, que ça soit au niveau aortique ou bien mitral, une surcharge de pression se crée entre les deux compartiments de part et d'autre de la valve [7]. Ceci peut causer une hypertrophie ventriculaire lors d'une sténose valvulaire aortique ou bien de la congestion pulmonaire et de l'œdème des membres inférieures dans le cas d'un dysfonctionnement de la valve mitrale [8]. Les valvulopathies peuvent être acquises ou dégénératives. Les cardiopathies rhumatismales causées par une infection bactérienne pendant l'enfance, un exemple d'une valvulopathie acquise, se manifestent plusieurs années plus tard par une atteinte au niveau des valves cardiaques et des articulations [9]. Les patients souffrant de ces maladies ont généralement recours à une opération de remplacement de la valve [6]. La calcification de la valve aortique ainsi que sa sténose sont généralement de valvulopathies dégénératives [7].
- La cardiopathie congénitale réfère à une maladie au niveau de la structure du cœur causant des malformations à la naissance. Cette pathologie peut affecter la circulation sanguine dans le cœur et les poumons et entraîner la mort dans certains cas si les malformations ne sont pas corrigées chirurgicalement [12].
- La maladie vasculaire périphérique affecte la circulation principalement dans les jambes. Les patients atteints de cette maladie souffrent généralement de douleurs au niveau des mollets lors d'un effort physique (claudication intermittente) [13].

1.1 Les facteurs de risque

Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires sont nombreux et sont divisés en deux parties : les facteurs contrôlables et les facteurs non contrôlables par la personne. Plusieurs algorithmes de calcul sont utilisés afin de prédire le pourcentage de risque d'avoir un incident cardiovasculaire. L'indice le plus célèbre est celui de l'étude Framingham qui a été présenté la première fois en 1998 [14] et qui a eu plusieurs mises à jour jusqu'en 2008 [15]. Plusieurs considèrent que ce modèle de calcul de risque n'est pas optimal pour différentes populations comme les asiatiques et la catégorie d'âge de plus de 85 ans. Il existe également SCORE [16], ATP III [17], QRISK2 [18], ACC/AHA pooled cohort 2013 [19], MESA [20] et PREDICT [21] qui ont été développés pour une meilleure prédiction du risque cardiovasculaire chez des patients appartenant à des populations spécifiques.

1.1.1 Les facteurs de risque contrôlables

Parmi les facteurs de risque les plus connus nous citons :

- Le tabagisme, par son implication entre autres dans l'augmentation de la tension artérielle [22] et par le développement des plaques d'athérosclérose au niveau des artères dû à son effet pro-inflammatoire et pro-oxydant [23].
- Le taux de LDL-cholestérol élevé (hypercholestérolémie familiale entre autre) , par son implication directe et nocive dans le blocage des artères par la formation de plaques d'athérosclérose [24].
- Le diabète augmente le risque de maladie cardiaque, en particulier si le niveau de glucose dans le sang est mal contrôlé [25]. En effet, l'augmentation des taux d'insuline dans le sang pourrait augmenter les dépôts de gras dans les artères.
- La pression artérielle élevée est une des causes principales de l'insuffisance cardiaque puisqu'elle induit entre autres une hypertrophie au niveau du muscle cardiaque [26].
- La sédentarité ou le niveau insuffisant d'exercice : il est connu que l'exercice réduit le risque des maladies cardiovasculaires puisqu'il induit différents effets protecteurs au niveau vasculaire par la sécrétion des "Heat shock protein" (HSP) [27].

- L'obésité et l'accumulation de tissus adipeux augmentent le risque de maladies cardiovasculaires par l'augmentation de la formation de plaques sur les artères [28].
- Des niveaux élevés de stress ou de stress prolongé peuvent entraîner un taux de cholestérol élevé, une augmentation de la pression artérielle ou des perturbations du rythme cardiaque. Ces conditions augmentent le risque de développer une maladie cardiaque [29].

1.1.2 Les facteurs de risque non-contrôlables

- Les antécédents familiaux sont parmi les facteurs de risque les plus importants dans la prédiction des maladies cardiovasculaires (MCV). En effet, les patients atteints d'une hypercholestérolémie familiale (FH) par exemple ont un risque plus élevé de développer des MCV [30].
- L'âge des patients est directement corrélé avec le développement des MCV. En effet, grâce aux avancées continues dans les soins médicaux et dans la technologie, les êtres humains vivent plus longtemps. Étant donné que l'insuffisance cardiaque et les MCV en général sont des maladies progressives qui se développent avec l'âge, le nombre de personnes atteints de ces maladies augmente [15].
- Le sexe : les hommes de jeune âge sont plus à risque de développer des MCV que les femmes. Cependant, les femmes ménopausées souffrant de maladies coronariennes deviennent plus à risque de développer les MCV que les hommes [31]. Les causes ne sont pas complètement connues et demeurent hypothétiques (hormones féminines, charge en fer sérique entre autres) [31].

1.2 L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie progressive. Elle constitue une charge socio-économique importante vu les coûts liés aux hospitalisations répétitives ainsi qu'à la médication que ces patients reçoivent [32]. L'IC est divisée en deux formes distinctes :

- 1- l'IC systolique (ou insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite) où le cœur du patient présente un problème de contraction et donc un défaut d'éjection du sang vers les organes.
- 2- l'IC diastolique (ou insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée) qui se manifeste par une incapacité du cœur à se relaxer adéquatement pendant la phase active de diastole. Le remplissage de ce dernier est alors sous-optimal et se fait sous fortes pressions [33]. Nous nous concentrerons sur l'IC avec fraction d'éjection préservée pour le reste de la thèse.

1.2.1 L'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée (ICFEP)

Cette forme d'insuffisance cardiaque réfère à une dysfonction diastolique (DD) du ventricule gauche. Lorsqu'il y a présence de symptômes, cette pathologie est appelée en anglais "HFpEF" pour "Heart failure with preserved ejection fraction". Le nombre de personnes atteintes de cette pathologie ne cesse d'augmenter puisque la population nord-américaine devient une population de plus en plus vieillissante [36]. Environ la moitié des patients ayant une insuffisance cardiaque présente une fraction d'éjection du ventricule gauche normale ou préservée (plus de 50%) [35]. Les femmes sont plus à risque de développer cette maladie que les hommes [38]. Les causes derrière cette constatation ne sont pas parfaitement connues. En effet, les femmes sont plus susceptibles à développer une hypertrophie concentrique et moins d'hypertrophie excentrique en réponse à l'hypertension artérielle. Aussi, avec l'âge la rigidité artérielle et ventriculaire augmente davantage chez les femmes plus que chez les hommes [39]. Des injections de testostérone chez les patients améliorent leur tolérance à l'exercice [40]. Toutefois, une autre étude a montré un effet délétère de ces injections de testostérone chez les hommes [41]. Différentes études ont également montré que des femmes pré- vs postménopause montrent un plus grand risque de développement de la DD sans une altération de la fonction systolique [42-44]. Un lien entre la déficience en œstrogène et la DD a également été établi [45]. Cependant, les études basées sur l'hormonothérapie (précoce mais pas tardive) par l'administration de l'œstrogène chez les femmes ménopausées ont montré des effets bénéfiques sur la fonction diastolique [46].

1.2.2 Les facteurs de risque de l'ICFEP

Les facteurs de risque de l'ICFEP ressemblent à celles pour la majorité des MCV que nous avons citées plus haut. Parmi ces facteurs nous retrouvons donc l'hypertension artérielle, le vieillissement, les maladies coronariennes, l'apnée du sommeil, l'obésité, le diabète et les maladies rénales [47].

1.2.3 Les symptômes

Les symptômes de l'ICFEP ressemblent à ceux de l'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite (ICFER). En effet, les patients présentent une dyspnée (même au repos si le stade est avancé), de la fatigue, une pression augmentée au niveau des veines jugulaires, des râles pulmonaires ainsi que de l'œdème au niveau des membres inférieures [48]. Étant donné que le remplissage du ventricule gauche se fait difficilement et sous des pressions élevées, la fibrillation auriculaire n'est pas bien tolérée par les patients d'ICFEP. La proportion du remplissage actif du ventricule gauche est plus importante chez ces patients. Une irrégularité dans le remplissage par contraction auriculaire aggrave donc la situation et pourrait entraîner une baisse dans le débit cardiaque [49]. Aussi, la pression artérielle systémique augmentée, en particulier les élévations brusques et sévères souvent observées avec l'hypertension réno-vasculaire, augmente le stress de la paroi ventriculaire gauche et altèrent la relaxation myocardique et est également moins bien tolérée par les patients d'ICFEP.

1.2.4. Diagnostic

Pour recevoir un diagnostic d'ICFEP, le patient doit avoir les symptômes de l'IC mentionnée ci-haut additionné à une fraction d'éjection préservée ($\geq 50\%$) calculée par échocardiographie et un ratio $E/Em \geq 15$ [50]. Les niveaux de peptides natriurétiques de type B (BNP) font également partie du diagnostic ($BNP > 100$ pg/mL ou $NT\text{-}proBNP > 300$ pg/mL) [51]. L'utilisation d'un cathéter pression-volume est parfois recommandée afin de valider le diagnostic à l'aide de cette mesure plus invasive.

1.2.5 Échocardiographie

1.2.5.1 Principes et paramètres de mesure de la DD

L'échocardiographie est la technique d'imagerie la plus utilisée pour détecter et évaluer la dysfonction diastolique (DD) dans le contexte de l'ICFEP. Le myocarde, le péricarde, les valves et les gros vaisseaux sont évalués par le test d'échocardiographie en deux dimensions (2D).

Avec la composante de Doppler, il est possible de mesurer la vitesse du débit sanguin [52, 53] ainsi que des paramètres de contractilité du muscle cardiaque. Généralement, cette technique d'imagerie est utilisée directement à la paroi thoracique (échocardiographie transthoracique - ETT), cependant, elle peut toujours être performée par voie transoesophagienne (ETO) [54].

Plusieurs avantages sont reliés à l'utilisation de l'échocardiographie dans le diagnostic de l'ICFEP. Premièrement, c'est une méthode rapide, non-invasive et peu coûteuse. De plus, elle permet de mesurer le volume, la fonction et l'épaisseur du ventricule gauche (VG) simultanément. Il est également possible de visualiser les autres chambres cardiaques et d'estimer leur volume. Deuxièmement, l'échocardiographie est la méthode de choix qui permet de visualiser la morphologie et la mobilité des valves. Ainsi, un épaissement de la valve, une diminution de sa mobilité ou un rétrécissement de son aire d'ouverture constituent les critères d'une sténose valvulaire aortique [52]. Troisièmement, l'écho 2D est utilisée pour l'étude du péricarde et des masses intracardiaques. Elle permet également une bonne évaluation des affections de l'aorte ascendante et descendante.

En échocardiographie, les ultrasons permettent de visualiser la direction du flot sanguin par un système de couleur surimposé sur les images 2D: par convention, le rouge indiquant le sang se dirigeant vers la sonde, le bleu indiquant le sang s'éloignant de la sonde et le vert indiquant un flot turbulent. De plus, nous pouvons apprécier la vitesse du flot sanguin à un endroit précis à l'aide d'un tracé d'ondes captées par le Doppler. Enfin, l'écho Doppler permet de mesurer le débit cardiaque et les valeurs de remplissages diastoliques qui sont primordiales pour l'évaluation des IC.

Les lignes directrices de l'évaluation de la DD sont publiées par l'Association Américaine du Cœur (American Heart Association : AHA) ainsi que par la Société Européenne

de Cardiologie (European Society of Cardiology : ESC)[54, 55]. En résumé, le tracé d'une courbe de la vélocité transmitrale permet de calculer les gradients de pression entre l'oreillette et le ventricule durant la diastole. Ces valeurs sont influencées par la vitesse de relaxation ventriculaire, la résistance au niveau de la valve mitrale et la compliance du ventricule [56]. Ainsi, la progression de la DD peut être évaluée par les courbes de Doppler.

Une classification de la sévérité ou bien du stade de la DD est possible par l'utilisation de plusieurs paramètres échocardiographiques [33, 52]. Trois catégories principales englobent la majorité de ces paramètres : les mesures du flot sanguin transmitral, les mesures tissulaires au niveau de la valve mitrale et les mesures du flot au niveau des veines pulmonaires [52]. En commençant par les mesures du flot sanguin transmitral, l'onde E (E pour early) représente le remplissage initial passif du VG pendant lequel le plus grand volume de sang passe de l'oreillette gauche (OG) vers le VG. L'onde A (A pour atrial) représente le remplissage par contraction auriculaire et pendant lequel environ 25% du volume de sang total éjecté passe de l'OG vers le VG. Dans le cas normal, le ratio calculé de ces ondes se situe entre 1 et 2 ($1 < E/A < 2$). Dans la phase initiale de la DD, il y a d'abord une atteinte de la relaxation ventriculaire gauche associée à une diminution de la vélocité du flot transmitral (onde E) en début de diastole (protodiastolique) et une élévation compensatoire du flot durant la phase de contraction auriculaire (onde A). À ce stade, le ratio E/A est < 1 . Plus la maladie progresse, plus la compliance ventriculaire diminue alors que la pression auriculaire est augmentée. Ceci entraîne alors une plus haute vélocité transmitrale protodiastolique et une décélération du flot plus rapide (i.e. le temps de décélération de l'onde E diminue). Ceci donne l'impression d'une normalisation des pressions de remplissage (pseudo normalisation) avec un ratio E/A normal. Dans ce dernier cas, la composante Doppler tissulaire sera indispensable dans la classification de la DD (voir prochain paragraphe). Finalement, dans les stades avancés de la maladie, où la pression auriculaire est d'autant plus élevée, la pression protodiastolique est encore plus haute. Il est question à ce moment d'une atteinte restrictive du remplissage (ratio $E/A > 2$).

La deuxième catégorie de paramètres utilisés dans l'évaluation de la DD implique les mesures du Doppler tissulaire au niveau de l'anneau de la valve mitrale. Ici, la vélocité du mouvement de l'anneau mitral est évaluée en relation avec le flot sanguin durant le remplissage passif (E' ou E_m) et actif (A' ou A_m) du VG. Dans le cas d'une fonction diastolique normale, le mouvement durant E' est plus grand que celui durant A'. Plus la sévérité de la DD évolue, plus

E' diminue. Le ratio E/E' est surtout utilisé dans le cas d'une DD pseudonormale [57]. Plus ce ratio augmente, plus nous approchons d'une DD sévère. D'ailleurs, ce rapport E/E' est souvent considéré comme un des paramètres les plus révélateurs du stade de la DD [58]. Un paramètre important lié à la relaxation ventriculaire, appelé temps de relaxation isovolumique (IVRT), est le temps calculé entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale. Ce dernier augmente lors de la présence des troubles de relaxation ventriculaire, alors qu'il est raccourci lors de la rigidité et la présence de troubles de compliance du VG [52].

La troisième catégorie comporte des mesures au niveau des veines pulmonaires. Deux paramètres de vitesse pulmonaire, soit S (ou PV_S) et D (ou PV_D) (S pour systolique et D pour diastolique), ainsi que leur ratio donnent des renseignements additionnels à ceux que nous avons cités plus haut quant à la sévérité de la DD. Dans le cas d'une fonction diastolique normale, la vitesse du flot pulmonaire durant la systole et la diastole est égale (S=D). En cas de faible DD, S devient plus grand que D (S>D). Dans un état de DD plus sévère, ces deux paramètres passent de S>D à S<D et même à S<<<D dans le cas restrictif irréversible. À ce stade, un œdème pulmonaire associé à une grande régurgitation (de l'oreillette vers les poumons) due à la rigidité ventriculaire est noté. La vitesse de ce flot de sang régurgité (Ar ou PV_A) ainsi que sa durée (Ar-dur) sont aussi évaluées lors de l'échocardiographie au niveau des veines pulmonaires. Plus Ar et Ar-dur sont grands, plus la DD est sévère. Un patient qui atteint ce niveau de maladie possède donc un pronostic très défavorable [33, 52].

1.2.5.2 Limitations de l'échocardiographie par la composante Doppler 2D dans l'évaluation de la DD.

L'approche Doppler 2D possède plusieurs limitations à considérer dans l'examen routinier de l'ICFEP. Premièrement, afin d'obtenir des mesures de remplissage diastolique du VG et des flux veineux pulmonaires Doppler de bonne qualité chez les patients, il serait important de standardiser l'approche en donnant une attention particulière à la taille et à l'emplacement du volume de mesure, à l'ajustement des filtres et la qualité des signaux. Il faut aussi comprendre que la DD est une pathologie complexe à évaluer. Plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats obtenus tel que l'âge, les anomalies de la pré-charge, post-charge, la fonction systolique du VG, les valvulopathies et la présence d'arythmies auriculaire.

Finalement, la présence de tachycardie ou d'un intervalle PR prolongé entraîneront la fusion des vitesses E et A, ce qui rendra le calcul des ratio E/A et E/Em difficile à faire [59].

1.2.5.3 Nouvelles modalités de mesures échocardiographiques dans l'évaluation de la DD.

Ces limitations ont incité à mettre au point de nouvelles modalités pour l'évaluation de la fonction diastolique dont l'échocardiographie Doppler en mode M couleur. Cette dernière analyse les déplacements de phase d'une série de pulsations échocardiographiques appariées et permet d'obtenir les vitesses le long d'une ligne de lecture. Les vitesses ont un codage couleur et sont affichées, le temps étant placé sur l'axe x (augmentant vers la droite) et la profondeur captée par le transducteur sur l'axe y (augmentant en sens opposé de celui du transducteur). On obtient une distribution spatio-temporelle de ces vitesses le long d'une ligne verticale. Ainsi, un enregistrement en mode M couleur à l'aide du curseur en mode M placé au centre de la région du remplissage diastolique du VG (parallèle au flux) dans l'incidence apicale 4-chambres donne une représentation des vitesses du sang à différents niveaux depuis l'orifice de la valve mitrale jusqu'à l'apex du VG. D'autres paramètres de l'enregistrement en mode M couleur sont investigués [60]. Des études cliniques préliminaires suggèrent qu'il existe une forte corrélation négative entre la vitesse de propagation (V_p) en mode M couleur et le tau, constante de temps de la relaxation (mesurée de façon invasive). Ainsi, à mesure que la fonction diastolique s'aggrave, la vitesse de la propagation (V_p) diminue, une corrélation qui est indépendante de la pré-charge [60].

Une troisième approche a été rajouté sur l'examen échographique de la DD qui s'appelle le "strain" ou "strain rate". En effet, ça permet d'évaluer la déformation ou le déplacement du myocarde. En d'autres termes, nous pouvons déterminer le raccourcissement ainsi que le "twisting" du cœur [61]. L'importance de cette approche découle de l'idée qu'avec le temps, un objet mobile change sa position (déplacement), mais ne subit pas de déformation si toutes ses parties se déplacent à la même vitesse. Si, toutefois, différentes parties de l'objet se déplacent avec des vitesses différentes, l'objet va subir la déformation et va changer sa forme. Ainsi les mesures de mouvement de la paroi (de déplacement et de vitesse) ne peuvent pas différencier entre le mouvement actif et passif d'un segment du myocarde, alors que les analyses de déformation (Strain et strain rate) permettent la discrimination entre ces types de mouvement du tissu myocardique.

Des études de comparaison entre le doppler tissulaire et le “strain rate” montrent que ces deux nouvelles techniques sont aussi précises pour l’évaluation de la DD légère chez les patients atteints d’ICFEP [62]. Cependant, le “strain rate” pourrait être plus utilitaire dans le cas où le doppler tissulaire révèle des résultats d’une fonction diastolique normale ou même chez les plus jeunes patients qui ne présentent pas une assez importante hypertrophie cardiaque [63, 64].

1.2.6 Les niveaux de peptides natriurétiques dans le diagnostic de l’ICFEP

Tel que mentionné plus haut, les taux plasmatiques du peptide natriurétique BNP ou son précurseur N-terminal, le NT-proBNP, font partie du diagnostic de l’IC [51]. Il est important de noter que les valeurs de ces marqueurs plasmatiques sont augmentées dans les deux formes de l’IC. Elles sont généralement plus élevées chez les patients avec ICFER. Par contre, il n’existe pas de valeurs connues qui distingueraient l’ICFER de l’ICFEP [65, 66]. Des valeurs de BNP > 100 pg / mL ou NT-proBNP > 300 pg / mL peuvent être considérées révélatrices d’une possible IC [51]. Pour un niveau de BNP donné, le pronostic chez les patients avec ICFEP est similaire à celui des patients avec ICFER [66].

Bien que la mesure du BNP plasmatique soit facile et rapide à obtenir, elle ne suffit pas seule à trancher un diagnostic d’IC. Ce biomarqueur constitue un indice d’IC qui doit être confirmé en échocardiographie et quelques fois en cathétérisme. Les valeurs de BNP doivent être interprétées avec vigilance puisqu’elles dépendent de beaucoup de facteurs confondants. Les facteurs limitants la sensibilité et la spécificité des niveaux de peptides natriurétiques incluent l’effet de l’insuffisance rénale (qui provoque des taux élevés de BNP et même une élévation plus importante des taux de NT-proBNP) et l’effet de l’obésité (baisse des niveaux de BNP et NT-proBNP). Par conséquent, comme indiqué ci-dessus, un niveau normal de BNP ou NT-proBNP n’exclut pas le diagnostic d’une ICFEP [67].

1.2.7 Le cathétérisme

Compte tenu de l’utilité des méthodes non invasives, en particulier l’échocardiographie, le cathétérisme cardiaque n’est pas systématiquement requis pour le diagnostic et l’évaluation de

l'IC. Cependant, chez les patients pour lesquels il est difficile de confirmer le diagnostic d'ICFEP après une échocardiographie, le cathétérisme demeure incontournable.

En effet, des cathéters pression-volume sont souvent utilisés afin de mesurer les changements au niveau du VG pendant la systole et la diastole. Parmi les paramètres étudiés nous retrouvons : la pression maximale (Pmax) et minimale (Pmin), la pression télédiastolique (LVEDP), la dérivée de temps de la différence positive et négative de la pression (dp/dt et $-dp/dt$, respectivement), le volume d'éjection systolique (SV), le volume télédiastolique (LVEDV) ainsi que leur ratio : la fraction d'éjection ($EF = SV / LVEDV$). Lors d'une ICFEP, une augmentation de la pression télédiastolique peut être détectée par le cathéter [68]. La pré-charge, post-charge ainsi que la contractilité du VG peuvent être mesurées à l'aide de la courbe P/V.

Des corrélations entre les mesures hémodynamiques et échocardiographiques ont déjà fait l'objet de différentes études [58, 69]. En effet, la pression télédiastolique du VG mesurée par cathéter (LVEDP) corrèle avec le ratio E/E' mesuré par échocardiographie [58].

Parmi les inconvénients de l'utilisation du cathétérisme par rapport aux études par échocardiographie avec Doppler on note d'abord l'aspect invasif de la technique. De plus, contrairement à l'échocardiographie, ces mesures ne peuvent pas être répétées à plusieurs reprises dans une étude de courte durée. Cela empêche d'obtenir un suivi régulier de la progression de la maladie par exemple. Un tel suivi est un aspect que nous utilisons souvent dans les études expérimentales et surtout lors de l'évaluation de l'effet d'un médicament sur une maladie. Finalement, cette intervention par cathéter engendre des coûts plus considérables comparé à la technique d'imagerie par échocardiographie.

1.2.8 Physiopathologie de l'ICFEP

Les patients souffrant d'ICFEP présentent les symptômes de la maladie et une DD au niveau du VG. Il existe une différence entre l'ICFEP et la DD. En effet, la DD réfère à un problème de fonctionnalité du ventricule gauche (VG). Ceci se traduit par une incapacité du VG à se relaxer adéquatement, une augmentation des pressions de remplissage du VG et une rigidité de ce dernier [70]. La DD progresse avec l'âge et ne finit pas toujours par devenir une ICFEP. Un

patient peut avoir une DD sans avoir une ICFEP, c'est-à-dire qu'il n'en est pas symptomatique. Cependant l'inverse est impossible.

Chez une personne en santé, pendant la diastole, la pression du VG et de l'OG chute rapidement. Ceci favorise l'effet d'aspiration qui permet le remplissage ventriculaire en augmentant le gradient de pression OG-VG et en entraînant le sang dans le ventricule. La plus grande partie du remplissage ventriculaire se produit durant cette phase. Ceci est le remplissage passif [71].

Ensuite, durant les dernières phases de la diastole, le VG normal reste souple et extensible, avec une résistance minimale à un remplissage supplémentaire. La contraction auriculaire contribue à compléter le remplissage du VG (environ 25% au volume total) sans augmenter les pressions diastoliques de plus de 5 mmHg. Ceci est le remplissage actif [71].

Lors de la progression de la pathologie associée à l'ICFEP, les propriétés de remplissage diastolique du VG changent. Ainsi, la relaxation et l'extensibilité du VG diminuent. Ceci entraîne une augmentation des pressions de remplissage du VG, ce qui cause une augmentation des pressions au niveau de l'OG et des veines pulmonaires. Ces pressions élevées au niveau des veines pulmonaires peuvent affecter les échanges gazeux et contribuent aux symptômes de la dyspnée [72]. Le remplissage sous pressions élevées devient de plus en plus difficile lorsque la pathologie est avancée. La rigidité ventriculaire élevée cause une IC congestive. Dans le cas où la relaxation du VG est altérée, les quantités de sang remplies par voie passive versus active sont diminués en faveur de la voie active [52].

Au niveau chronique, la structure du VG change lors d'une DD. En effet, un remodelage de la paroi de ce dernier peut survenir et une hypertrophie cardiaque concentrique est remarquée par échocardiographie. Contrairement à l'ICFER où l'hypertrophie cardiaque est plus excentrique, le volume des cardiomyocytes ne change pas, cependant leur diamètre augmente [73].

En parallèle, plusieurs études ont rapporté une augmentation de la quantité de collagène avec une augmentation dans la largeur et la continuité des composants fibrillaires de la matrice extracellulaire [74, 75]. Bien qu'il y ait généralement plus de fibrose interstitielle chez l'ICFEP que chez les contrôles en bonne santé, les différences ne sont pas énormes et de nombreux patients peuvent ne pas montrer de signes évidents de fibrose [76]. En revanche, l'ICFER a été associée à la dégradation du collagène fibrillaire, du moins au début de son développement.

Dans un stade plus avancé, la fibrose de réparation et la cicatrisation ischémique peuvent entraîner une augmentation globale du collagène fibrillaire dans la matrice extracellulaire.

1.2.9 Mécanismes impliqués dans la DD

Mis à part l'hypertrophie ventriculaire et la fibrose cardiaque, plusieurs mécanismes et altérations au niveau cellulaire peuvent affecter la fonction diastolique et engendrer une ICFEP [77, 78]. En effet, l'homéostasie calcique [79], le système neuro-hormonal [80], le stress oxydant [81], l'inflammation [82] et les formes de la titine [83] pourraient être impliqués dans la DD.

1.2.9.1 L'homéostasie calcique

Le calcium est l'ion principal dans le phénomène de contraction-relaxation du muscle cardiaque. En effet, la contraction commence par une entrée d'un courant calcique pendant le potentiel d'action via le canal calcique voltage-dépendant du réticulum sarcoplasmique (RS). Cette quantité de calcium induit un phénomène appelé en anglais "Calcium induced-calcium release" par lequel une très grande quantité de calcium est libérée du RS dans l'espace intracellulaire via le récepteur à la ryanodine (RYR2) [84]. Les niveaux de calcium cytosolique augmentent rapidement et le calcium se lie à la troponine C par le motif structural "la main EF" de cette troponine C libérant ainsi l'actine et permettant sa liaison à la myosine et la contraction musculaire [79].

Pour que la relaxation des myocytes se produise, le cytosol doit être rapidement débarrassé du calcium. Une fois ce calcium dissocié de la troponine C, les liaisons actine-myosine génératrices de tension sont éliminées. La clairance diastolique du calcium cytosolique vers le RS est un phénomène actif nécessitant l'utilisation de l'adénosine triphosphate (ATP) pour activer les pompes sarco/endoplasmique réticulum Ca^{2+} (SERCA2) situés sur la membrane du RS [79]. Le niveau d'expression de ces pompes ATPases est proportionnel à la vitesse de relaxation musculaire [85, 86]. Les études ont montré une diminution de l'expression de SERCA2 dans un contexte de DD [87]. La phosphorylation de SERCA2 par le phospholamban (PLB) inhibe son activité [88]. À son tour, le PLB peut être phosphorylé (inhibé) par la protéine kinase A ou bien par la calmoduline-kinase (CAMK) [89, 90]. Des thérapies génétiques qui

surexpriment la SERCA2 ou bien inhibent son inhibiteur le PLB ont montré une voie thérapeutique très intéressante contre la DD [91, 92].

L'élimination du calcium cytosolique peut également se produire via un échange sodium-calcium à travers l'échangeur membranaire NCX (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Chaque ion de calcium sorti fait rentrer trois ions sodium à l'intérieur de la cellule [93]. C'est un processus énergie-dépendant puisque l'entrée du sodium se fait contre le gradient de sa concentration cellulaire [94]. Des études ont montré une augmentation de l'expression de cet échangeur lorsqu'une diminution de l'expression du SERCA2 est remarquée ou bien induite [95]. L'activité de cet échangeur baisse lors d'une grande accumulation du sodium intra cytoplasmique [96].

1.2.9.2 Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAA)

Le rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) a souvent été documenté dans les études d'hypertension et de maladies cardiovasculaires en général [97]. Ce système est directement impliqué dans l'IC et la DD. La rénine est synthétisée dans les cellules juxtaglomulaires des reins. C'est une protéase qui clive l'angiotensinogène en angiotensine I qui est biologiquement inactive [98]. L'angiotensine I est ensuite convertie, par les enzymes de conversion de l'angiotensine (ACE) ou par les chymases, en angiotensine II (AngII) active. Cette dernière est un peptide qui augmente la pression sanguine en agissant sur la sensation de soif (un plus grand apport d'eau) et la sécrétion de l'aldostérone. Au niveau vasculaire, l'Ang II augmente la tension artérielle puisqu'elle induit une vasoconstriction par la contraction des cellules musculaires lisses [98]. L'Ang II est également impliqué dans le processus de fibrose. Ce processus augmente ainsi la rigidité du tissu cardiaque [99, 100]. L'action de l'Ang II passe surtout par sa liaison à son récepteur de type I (AT1) activant la sécrétion de l'aldostérone. Une sécrétion de ce dernier peut entraîner une rétention hydro-sodique et par la suite une hypertension artérielle. Des inhibiteurs de la rénine, de l'ACE, des récepteurs de l'angiotensine et de l'aldostérone ont montré des améliorations de la fonction cardiaque ce qui a donné à cette voie une importance exceptionnelle dans les recherches cliniques (voir figure 1)[101].

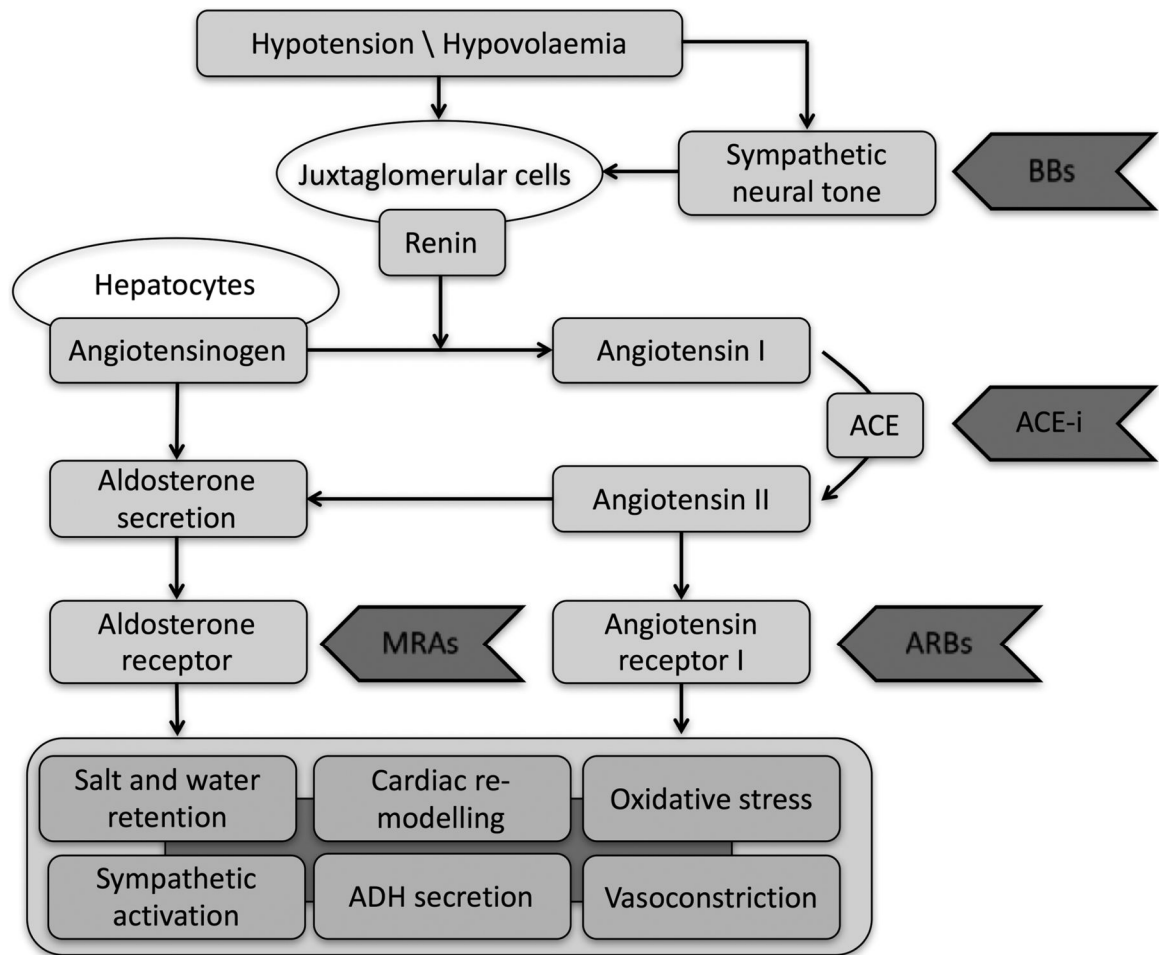


Figure 1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone et son implication dans la vasoconstriction et l'augmentation de la tension artérielle. Tirée de [101]

1.2.9.3 Les peptides natriurétiques

Tel que discuté plus haut, les peptides natriurétiques font partie du diagnostic de l'IC. En effet, leur famille est composée de trois types de peptides: le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le peptide natriurétique cérébral ou type B (BNP) et le peptide natriurétique de type C (CNP) [102, 103]. Chez l'humain, les trois peptides comportent une structure cyclique de 17 acides aminés, avec un pont disulfure (voir figure 2).

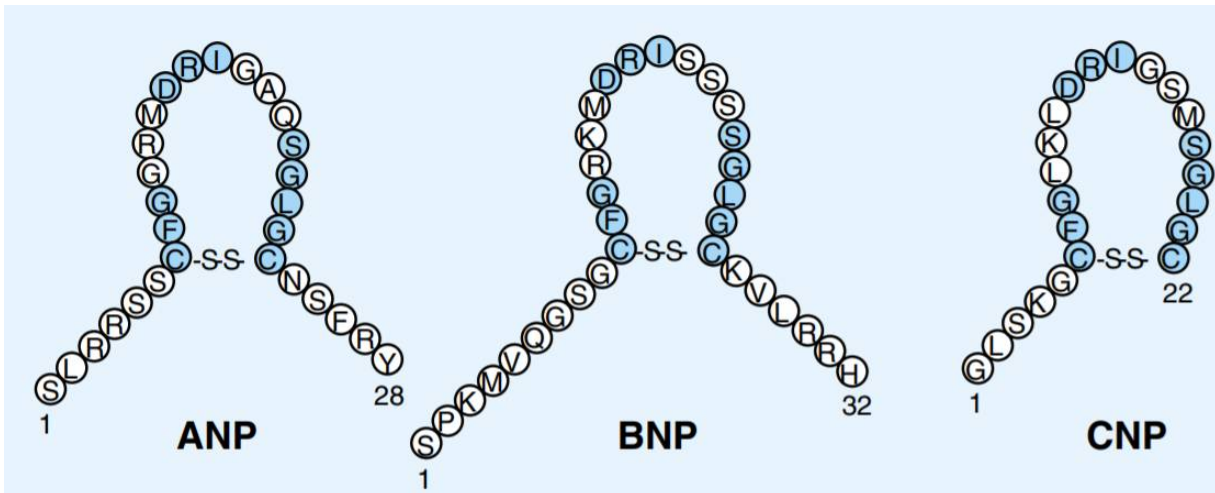


Figure 2. Structure des peptides natriurétiques humains. Les acides aminés conservés dans les différents peptides sont en bleu. Adaptée de [104]

Découvert dans les années 1980, l'ANP est essentiellement produit par les oreillettes [105]. Cependant, le BNP est principalement produit dans les ventricules. Il a été nommé « cérébral » parce qu'il a été isolé pour la première fois en 1988 par Sudoh et al. à partir de cerveaux de porcs [106]. Le CNP est sécrété par les cellules endothéliales. Contrairement aux deux autres peptides, ses taux plasmatiques sont faibles.

Une fois libérées dans la circulation, l'ANP et le BNP se lient aux récepteurs membranaires du tissu cible : le récepteur du peptide natriurétique A (NPR-A) et le récepteur du peptide natriurétique B (NPR-B). Ces récepteurs sont à l'origine des effets physiologiques de ces hormones. L'élimination des peptides natriurétiques se fait par deux différentes façons. Premièrement, ces peptides peuvent se lier au récepteur NPR-C (récepteur du peptide natriurétique C). Le complexe ligand-récepteur peut être internalisé dans la cellule par endocytose. Une hydrolyse du ligand par des lysosomes permet la dissociation du complexe et le recyclage du récepteur vers la membrane cellulaire [107, 108]. L'affinité du BNP au NPR-C par rapport à l'ANP est moindre. Ceci explique en partie le temps de demi-vie plus élevé que possède le BNP par rapport à l'ANP. Ces peptides natriurétiques peuvent également être

dégradés par l'ectoenzyme neutre endopeptidase (NEP). Parmi les 3 peptides natriurétique, le BNP est le plus résistant à la dégradation par la NEP [102, 103].

Au cours de l'IC, une vasoconstriction dû principalement au système RAA peut survenir. Afin de contrer cet effet vasoconstricteur de l'Ang II, la sécrétion du BNP et de l'ANP est essentielle. Ces hormones sont capables de réduire la quantité d'aldostérone (ce qui réfère aussi à une réduction de la rétention hydro-sodique) et de favoriser la vasodilatation [109]. Chez les humains ainsi que chez les animaux, les études ont montré une augmentation des niveaux plasmatiques des peptides natriurétiques, surtout BNP, lors d'une atteinte d'IC [110]. Aussi, l'expression de l'ARNm messenger des gènes du BNP et de l'ANP au niveau du tissu cardiaque a été augmentée chez les patients et les animaux avec DD [111, 112].

1.2.9.4 Le stress oxydatif

Le stress oxydant est un mécanisme impliqué dans plusieurs maladies cardiovasculaires dont la DD et l'hypertension artérielle [81] [113]. En effet, la formation des radicaux libres (ROS) favorise la mort cellulaire des cardiomyocytes. Les ROS les plus connus proviennent de la réaction de Fenton, par laquelle, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se décompose en HO^\cdot . Différents modèles de rats et de souris ayant une DD ont montré une augmentation du marqueur dihydroxyéthidium (DHE) indiquant l'augmentation des quantités de ROS [114, 115]. Ces derniers affectent également la fonction endothéliale réduisant la production d'oxyde nitrique (NO) qui aide à la relaxation vasculaire [116]. Aussi, une diminution des enzymes antioxydantes, comme la superoxyde dismutase, a été rapporté dans les études de l'IC [117].

1.2.9.5. L'inflammation

Les maladies coronariennes ainsi que plusieurs autres maladies cardiovasculaires, telles que la sténose valvulaire aortique, sont principalement des maladies inflammatoires [118]. Ainsi, l'inflammation joue un rôle très important dans la DD. Des études sur des modèles expérimentaux de DD ont montré une augmentation des cytokines inflammatoires au niveau du tissu cardiaque [111] [114]. En effet, l'ARNm de l'IL-6 et de la TNF- α augmente dans un contexte de DD chez le lapin [111]. Également, le contenu en macrophages ainsi que le gène du

ligand chimiotactique CCL2 ont été rapportés à la hausse chez le rat avec DD [114]. L'inflammation induit également un stress oxydant. Ce dernier tel que décrit plus haut, peut causer des dommages au niveau de l'ADN et induire la mort cellulaire. L'inflammation est également liée à la fibrose cardiaque. En effet, les macrophages contribuent à la fibrose cardiaque (dans un modèle d'hypertension) par la différenciation des monocytes en fibroblastes [119].

L'inflammation affecte également l'élasticité vasculaire ce qui pourrait augmenter la tension artérielle et mener à une hypertrophie cardiaque. Cette hypertrophie cardiaque pourrait causer la DD. Aussi, les cytokines inflammatoires induisent une dysfonction endothéliale qui se traduit par une diminution de l'expression de la synthase de NO (eNOS) et par l'augmentation de la présence des molécules d'adhésion VCAM et ICAM. Cette dysfonction endothéliale pourrait déclencher le processus inflammatoire menant à l'athérosclérose. L'inflammation pourrait également engendrer une DD [120] par l'augmentation de la rigidité du VG à la suite de l'augmentation de la fibrose au niveau de la matrice extracellulaire causée par la sécrétion de collagène par les fibroblastes.

La quantité ainsi que la fonction des macrophages sont très importants dans la DD. En effet, il existe plusieurs phénotypes de macrophages qui les différencient les uns des autres en termes de fonction et qui permet leur classification en sous-populations. Les deux grands phénotypes de macrophages sont les macrophages "pro-inflammatoires" M1 et les macrophages "anti-inflammatoires" M2. Dépendamment des cytokines du milieu extracellulaire, les macrophages peuvent se transformer en M1 ou M2. Il n'existe pas encore de consensus entre les chercheurs sur le rôle exact de chaque type. Les M1 secrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et les interleukines (IL) 1, 6, 8 et 12 [121]. Des études ont montré une augmentation des macrophages cardiaques dans un contexte de DD [114]. Les M2 secrètent des cytokines "anti-inflammatoires" tel que l'IL-4 et l'IL-13 et sont donc protecteurs contre l'inflammation dans la DD. Toutefois, des études ont montré que les M2 secrètent également de l'IL-10. Ce dernier active les fibroblastes qui secrètent à leur tour du collagène ce qui augmente la fibrose cardiaque et cause une DD [122]. Une délétion de l'IL-10 des monocytes/macrophages améliorerait la fonction diastolique tel qu'évalué par cathéter chez la souris [122]. Une exposition de ces macrophages à l'IL-10 recombinante de souris augmente

l'expression et l'activation des myofibroblastes par la voie de l'ostéopontine [122]. Ces résultats montrent donc un double rôle aux M2 : un rôle protecteur anti-inflammatoire et un rôle délétère pro-fibrotique.

Les neutrophiles ont également fait l'objet de différentes études dans la pathologie de la DD. En effet, un plus grand ratio de neutrophiles sur lymphocytes (neutrophiles/lymphocytes) a été retrouvé chez les patients hypertendus atteints d'une DD [123]. Ce ratio a été suggéré comme marqueur pour prédire la DD. Comme les macrophages, les neutrophiles peuvent avoir un rôle pro-inflammatoire supérieur lorsqu'ils se trouvent dans un milieu riche en cytokines inflammatoires produites par les cardiomyocytes et les cellules endothéliales [124].

D'autres cytokines inflammatoires ont montré un rôle important dans la DD. Le blocage de l'IL-1 par l'Anakinra, une protéine recombinante antagoniste du récepteur de l'IL-1, a montré une amélioration de la DD chez 12 patients atteints d'une ICPE. En effet, ce médicament a augmenté la tolérance à l'exercice (par l'augmentation de la consommation maximale d'oxygène VO_2 max) et a diminué drastiquement les niveaux de la CRP circulante [125]. Il est donc essentiel d'étudier et de bien comprendre l'implication de l'inflammation dans la DD.

Le rôle des mastocytes a récemment été étudié dans le contexte de la DD. Ces cellules secrètent nombreuses molécules biologiques actives tel que l'histamine, les protéases (ex : la chymase) et les cytokines inflammatoires (plusieurs types d'interleukines, $TNF-\alpha$, ...) [126]. L'inhibition des mastocytes par le "cromolyn sodium" a réduit le remodelage cardiaque et la DD chez les rats ovariectomisés [127]. Dans une autre étude, l'inhibition de la chymase sécrétée par les mastocytes cardiaques a montré une amélioration de la fibrose cardiaque et de la DD dans un modèle d'insuffisance cardiaque progressive chez le chien [128]. En effet, dans le cœur, la chymase possède un rôle important dans la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II même en présence des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA). Par ce fait, la chymase peut induire une fibrose interstitielle et une DD. Ces études montrent donc un rôle potentiel très important à considérer dans la recherche de nouvelles voies thérapeutiques contre la DD.

1.2.9.6 Les maladies coronariennes dans la DD

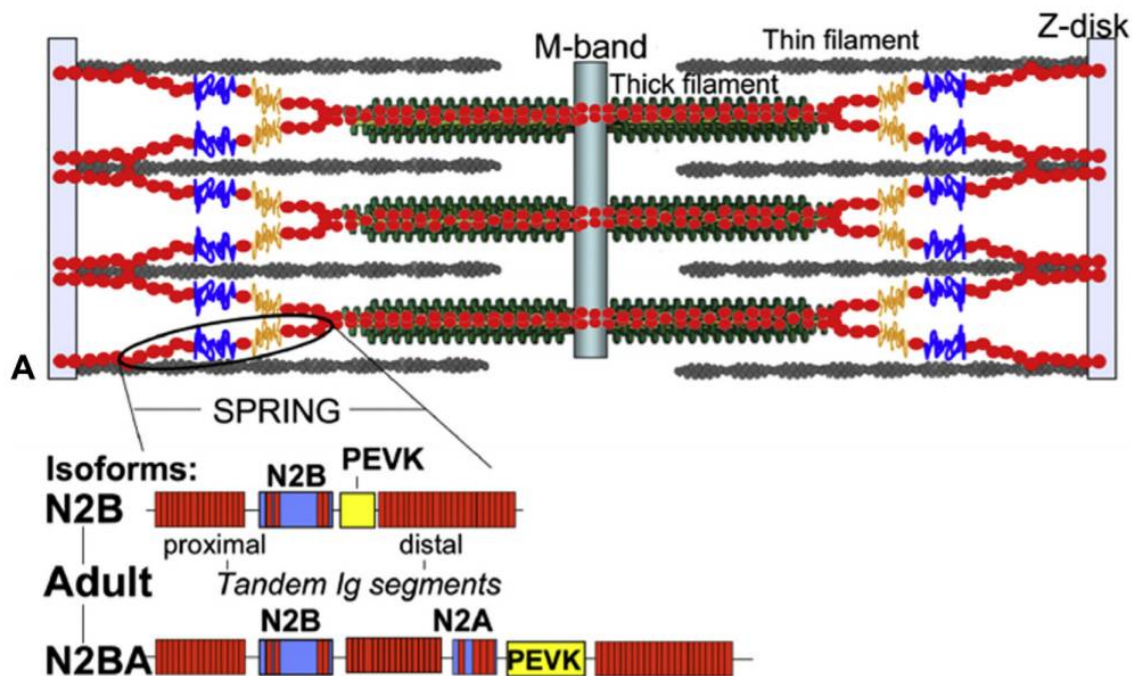
Il existe un lien étroit entre la présence des maladies coronariennes et la fonction ventriculaire. En effet, une ischémie cardiaque peut entraîner une DD ainsi qu'une DS. Environ deux tiers des patients souffrant d'une ICFEP sont atteints de maladies coronariennes [129]. Ces patients présentent une détérioration plus rapide de leur fonction ventriculaire et ont un risque de mortalité plus accrue [129]. Une revascularisation chez ces patients peut avoir des effets bénéfiques sur la DD. La perfusion myocardique est un élément important à considérer lors de l'évaluation de la présence ou non de la DD. Dans un stade précoce de maladies coronariennes, le flux coronarien peut répondre adéquatement aux besoins primaires du muscle cardiaque ce qui empêche l'apparition de symptômes de la DD. Toutefois, lors de l'exercice ou un stade plus avancé de la maladie coronarienne, la demande d'oxygène par le cœur augmente et le flux coronarien n'arrive pas à fournir le sang nécessaire. Ceci induit une transformation de la réserve de l'ATP en ADP dans le myocarde et empêche le cœur de se relaxer adéquatement (puisque le phénomène de la relaxation myocardique est ATP-dépendant) [130]. Cette dysfonction dans la relaxation peut causer une augmentation de la pression dans le ventricule et altère le remplissage diastolique [131]. Aussi, les études ont montré que l'ischémie cardiaque entraîne une augmentation des quantités du calcium intracellulaire [132]. Ceci pourrait avoir un impact sur la relaxation du myocarde durant la diastole. À son tour, la présence de la DD au repos pourrait être un indicateur supplémentaire dans le diagnostic des maladies coronariennes [133].

1.2.9.7 La titine

La titine est une protéine géante ayant un poids moléculaire d'environ 4 200 kDa. Dans le sarcomère, la titine occupe la distance du point Z (par sa région N-Terminale) au point M (par sa région C-Terminale) de l'unité contractile (figure 3). Elle est retrouvée dans les muscles squelettiques et cardiaques [134]. L'élasticité du muscle cardiaque dépend principalement des propriétés de la titine. En effet, à la suite d'une contraction cardiaque, cette protéine agit comme un ressort aidant le sarcomère à se détendre et à reprendre sa longueur initiale pendant la phase de remplissage passif diastolique [134]. Plus le sarcomère est relaxé rapidement, plus la pression du ventricule baisse et le remplissage se fait adéquatement. La titine subit des épissages alternatifs (au niveau de sa bande I) générant différents isoformes de la protéine. Les isoformes

cardiaques contiennent une région N2B qui les différencie de la forme squelettique. Deux isoformes cardiaques sont connus : N2B et N2BA. Les deux isoformes contiennent des régions immunoglobulines (Ig) proximales et distales ainsi qu'une région N2B et un domaine PEVK (domaine riche en proline, acide glutamique, valine et lysine) [135]. La N2BA possède un domaine N2A et une région de Ig médiane de plus que la forme N2B. La N2B est alors plus courte et plus rigide. La rigidité du muscle cardiaque pourrait être liée à deux aspects en lien avec la titine : le changement de l'isoforme et la phosphorylation [136].

Chez l'humain en santé, le ratio N2BA/N2B est d'environ 40/60 dans le VG. Lors d'une cardiomyopathie dilatée, le ratio N2BA/N2B augmente, diminuant ainsi la tension passive des cardiomyocytes afin de compenser pour la rigidité du contenu de la matrice extracellulaire des patients [137]. Ce ratio a été rapporté dans plusieurs études montrant une corrélation positive avec des paramètres d'échocardiographie de DD. Chez les animaux avec fréquence cardiaque



plus élevée, la forme N2B est plus dominante afin de maintenir un retour rapide à la basse pression et permettre le remplissage passif adéquat.

Figure 3. La titine dans un sarcomère ainsi que ses différents isoformes cardiaques.
Adaptée de [134]

La phosphorylation de la titine se fait sur la région N2B par des protéines kinases A et G (PKA/PKG) diminuant ainsi sa tension passive [138, 139]. Cependant, la phosphorylation du domaine PEVK de la titine par la PKC- α augmente sa tension passive [140]. Les études ont montré un rôle très important de cette protéine géante dans le développement de la DD [141].

2. Traitements contre l'ICFEP

Contrairement à l'ICFER, il n'existe aucun traitement efficace cliniquement approuvé contre l'ICFEP. En effet, les β -bloqueurs, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA), les bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine (ARBs) et bien d'autres médicaments n'ont pas d'efficacité significative contre l'ICFEP malgré leurs effets bénéfiques dans le contexte d'une ICFER. Ces résultats mettent en évidence la différence entre la pathophysiologie des deux formes de l'IC [142].

Actuellement, le traitement de l'ICFEP se résume par le traitement de ses "causes" sous-jacentes ainsi que par la gestion des symptômes que les patients présentent. En effet, deux points importants sont recommandés par l'AHA/ACC [143] et l'ESC [144]: le contrôle de l'hypertension artérielle afin d'améliorer la morbidité et l'utilisation des diurétiques afin de résoudre les œdèmes que les patients présentent. Plusieurs types de traitements sont utilisés et ces traitements seront présentés dans cette thèse selon les facteurs de risque en lien avec l'ICFEP et selon la classe de médicaments.

2.1 Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle occupe la première place parmi les facteurs de risque qui engendrent une IC. Cette hypertension chronique pourrait engendrer une hypertrophie cardiaque. Il existe plusieurs classes de médicaments qui sont utilisées dans la régulation de la tension artérielle systolique et diastolique. Le choix entre ces différentes classes se fait selon l'âge, l'ethnie et les autres facteurs de risque que le patient peut présenter [145]. Les évidences par rapport à l'utilisation de ces médicaments sont plus claires dans l'ICFER que dans l'ICFEP.

Le traitement d'une hypertension artérielle essentielle pourrait inclure une classe de médicament ou bien une combinaison de plusieurs molécules afin de réguler la tension artérielle dépendamment de la gravité de l'hypertension, de son étiologie et de la réponse du patient à la médication. Nous allons présentons ci-dessous un survol rapide des classes de médicament les plus utilisés dans ce contexte.

2.1.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA)

Il s'agit de la médication de première ligne dans l'hypertension artérielle chez les patients souffrant de l'IC [146]. Tel que le nom le dit, ce sont des inhibiteurs qui empêchent la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. L'ang II est responsable du maintien de la volémie et de la tension artérielle via son effet vasoconstricteur ainsi que son implication dans la sécrétion de l'aldostérone [147]. Par la diminution de la pression artérielle, ces médicaments diminuent l'hypertrophie ventriculaire ainsi que la fibrose cardiaque, deux processus très impliqués dans la DD. Cependant, aucune étude clinique n'a réussi à démontrer un effet direct des IECA sur l'ICFEP. Le développement de ces médicaments a commencé après la découverte d'un composé extrait du venin d'un serpent par le pharmacologiste Sergio Ferreira qui est capable de bloquer l'ECA. Le captopril et l'énalapril ont été développés vers le début des années 1980 et ont constitué la première génération de cette classe de médicament. Environ 10 ans plus tard, une deuxième génération de médicament de cette classe a été introduit dans le marché. Cette génération se différenciait de la 1^{ère} génération par une meilleure pénétrance au niveau tissulaire et une meilleure résistance à l'élimination du corps. Finalement, dans l'IC, les recommandations de l'ACC/AHA ont été favorables pour les iECA suivants : Captopril, Enalapril, Fosinopril, Lisinopril and Quinapril [148].

2.1.2 Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA)

Connu également sous le nom de bloqueurs du récepteur à l'angiotensine II, les ARA sont également utilisés pour réguler la tension artérielle. Cette fois-ci, au lieu de bloquer l'ang II elle-même, les ARA sont utilisés pour bloquer le récepteur de type 1 de l'ang II (AT-1R) [149]. À ce jour, les deux récepteurs connus pour l'ang II sont le récepteur de type 1 (AT-1R) et le récepteur de type 2 (AT-2R). Les effets physiologiques majeurs de l'ang II

(vasoconstriction, sécrétion de l'aldostérone, rétention sodique) passent par le AT-1R, récepteur pour lequel les ARA sont spécifiques. L'avantage de l'utilisation des ARAs en comparaison avec les iECA est que les effets bénéfiques (vasodilatateur par exemple) de l'ang II médiés par les AT-2R sont préservés [150]. La famille des ARA s'appelle les "sartans" et sont souvent utilisés chez les patients IC, diabétiques et ayant des maladies rénales. Cependant, les iECA sont plus souvent utilisés chez les patients IC ayant des maladies coronariennes et post-infarctus.

2.1.3 Les antagonistes de l'aldostérone

Tel que mentionné plus haut dans la section du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS), l'aldostérone est une hormone sécrétée par les glandes surrénales qui joue un rôle important dans le maintien de la volémie et la tension artérielle [151]. Les antagonistes de l'aldostérone font partie des molécules ayant un effet potentiel dans l'ICFEP. En effet, l'étude Aldo-DHF [152] a montré une amélioration de la DD chez les patients recrutés (amélioration du ratio E/E'). Cependant, la tolérance à l'exercice ainsi que les symptômes de l'ICFEP n'ont pas été améliorés. Une autre étude [153], incluant un plus grand nombre de patients (1722 patients), n'a pas réussi à montrer un effet significatif entre le groupe placebo et le groupe spironolactone (l'antagoniste utilisé) sur la mortalité par cause cardiovasculaire. Cependant, lorsque pris tout seul, l'indicateur de l'hospitalisation causé par l'IC était amélioré dans le groupe spironolactone comparé au placebo.

2.1.4 Les diurétiques

Les diurétiques sont utilisés afin de réduire l'excès de volume et l'œdème chez les patients symptomatiques souffrant de l'ICFEP. Ils sont souvent utilisés en combinaison avec les anti-hypertenseurs afin d'avoir un meilleur effet sur la baisse de l'hypertension artérielle. Ce sont surtout les diurétiques de l'anse (comme le Furosémide) qui sont utilisés dans l'IC afin d'augmenter la diurèse [154]. Ces médicaments inhibent principalement la réabsorption du sodium et du chlorure dans l'anse ascendante de Henle et des tubules rénaux proximaux et distaux, provoquant ainsi leurs effets natriurétiques [154]. Il est important de surveiller les patients afin d'éviter des situations d'hypovolémie et d'hyponatrémie.

2.1.5 Les inhibiteurs de la néprilysine

La néprilysine est une endopeptidase de type métalloprotéase. Elle dégrade les peptides natriurétiques tel que le BNP. Dans un contexte d'IC, l'inhibition de cette peptidase améliore la sécrétion des natriurétiques augmentant ainsi l'effet de diurèse de ces derniers [156]. En clinique, une combinaison de l'inhibiteur de la néprilysine avec le valsartan (un ARA), commercialisé sous le nom de "Entresto" a été démontré efficace et plus bénéfique que l'ARA tout seul dans l'ICFER [157]. Des essais cliniques prometteurs sont en cours afin de tester son effet potentiel sur l'ICFEP.

2.1.6 Les β -bloqueurs

C'est la famille des bloqueurs des récepteurs β -adrénergiques. L'hypothèse testant l'effet de ces médicaments contre l'ICFEP remonte à il y a 20 ans. Plusieurs essais cliniques ont montré des effets controversés quant à l'efficacité de cette famille de médicaments sur l'ICFEP. En effet, plusieurs générations de β -bloqueurs ont été testés chez des patients avec FE \geq 40%. En 1997, le propranolol a montré une réduction du taux de mortalité chez le groupe traité comparé au placebo. Cependant, J-DHF (japanese diastolic heart failure study) [158], n'a pas montré une différence dans le taux de mortalité et l'hospitalisation chez les patients IC du groupe recevant du Carvedilol en comparaison avec le groupe placebo [158]. D'autres études ont également montré l'inefficacité des β -bloqueurs dans l'ICFEP [159-161]. Récemment, des études animales ont montré une amélioration de la DD chez des rats zucker traités avec du nébivolol [162]. Les auteurs font référence à un effet anti-oxydant de ce médicament qui augmente l'activité de la synthase de l'oxyde nitrique (eNOS) et induit par conséquent la relaxation vasculaire [163].

2.2 Ivabradine

L'ivabradine, un inhibiteur des canaux I_f , est utilisé dans l'insuffisance cardiaque chronique afin de réduire la fréquence cardiaque. Il agit au niveau du nœud sino-atrial en inhibant les courants I_f automatisés [164]. Ceci augmente le temps de remplissage diastolique et améliore le débit cardiaque. Dans l'IC, il est connu que la fréquence cardiaque augmente afin de maintenir un débit cardiaque adéquat [165]. Cela dit, l'utilisation de l'ivabradine a montré une amélioration de la tolérance à l'exercice tout en ayant peu ou pas d'effet sur la contractilité

myocardique, sur la pression artérielle et sur la conduction intracardiaque. En d'autres termes, il y'a un effet chronotrope négatif sans avoir un effet inotrope négatif [166]. Des études cliniques ont été menées avec l'ajout de l'ivabradine aux traitements actuels des patients avec IC. L'ajout de ce médicament aux β -bloqueurs chez 3241 patients, a diminué de 18% la mortalité cardiovasculaire et les hospitalisations pour insuffisance cardiaque (étude SHIFT) [167]. Dans notre laboratoire, nous avons démontré une amélioration du score général de la sévérité de la DD chez le lapin hypercholestérolémique traité avec de l'ivabradine. Une diminution de la fibrose cardiaque auriculaire et ventriculaire, de la quantité d'ang II dans le sang ainsi que du stress oxydant ont également été rapportés dans les effets bénéfiques de ce médicament [168]. Cependant, en 2015, une étude menée chez 22 patients ayant une ICFEP a démontré un effet négatif de l'ivabradine sur la capacité d'exercice et sur le pic de saturation en oxygène [169]. Pas de changement significatif sur le ratio E/E' ni sur les quantités de BNP plasmatique entre le groupe traité à l'ivabradine vs placebo a été noté [169]. Cette étude a remis en question les conditions optimales (âge, dose maximale...) pour la prescription de l'ivabradine chez les patients avec ICFEP. Ces mêmes résultats ont été confirmés dans une nouvelle étude faite chez 179 patients avec ICFEP [170]. Donc, à ce jour, il n'y a pas d'évidence sur l'effet bénéfique de l'ivabradine sur l'ICFEP chez l'humain.

2.3 Les statines

Les statines sont des médicaments prescrits chez les patients dyslipidémiques ou atteints de maladies coronariennes et ayant des taux de cholestérol plasmatiques élevés. Ce sont des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl (HMG) CoA réductase, une enzyme limitante pour la synthèse hépatique du cholestérol. Ainsi, le blocage de l'HMG-CoA réductase diminue la production du cholestérol dans les cellules hépatiques et augmente l'expression du gène du récepteur de lipoprotéines à faible densité (LDL) à la surface des hépatocytes [171].

Plusieurs études ont montré un effet pléiotrope des statines. Mise à part leur effet principal défini ci-haut, les statines améliorent la fonction endothéliale, la stabilité des plaques d'athérosclérose et diminuent le stress oxydatif et l'inflammation, pour n'en nommer que quelques-uns. Beaucoup de ces effets pléiotropes sont médiés par l'inhibition des isoprénoïdes, des composés organiques impliqués dans la signalisation intracellulaire. En particulier, l'inhibition de la

production de farnesyl pyrophosphate bloque la voie des Ras impliqués dans les processus d'hypertrophie et du stress mitochondrial. Cependant, l'inhibition de la formation de geranylgeranyl pyrophosphate bloque la voie des Rho et Rac impliqués dans le stress oxydant et du remodelage vasculaire, entre autres [172].

En 2005, le premier essai clinique évaluant l'effet des statines sur l'ICFEP a montré une amélioration du taux de survie chez le groupe traité (N=68) vs non traité (N=69) [173]. Une méta-analyse sur un ensemble d'études rassemblant 5 536 patients a confirmé l'effet positif des statines sur la survie des patients ICFEP [174]. Cependant, il n'existe toujours pas dans les guidelines américains ou européens une recommandation pour l'utilisation des statines dans l'ICFEP, même si les quelques études dans ce sujet ont montré des résultats favorables [173, 174].

2.4 Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et les mimétiques de l'apoA-I.

Il existe de plus en plus d'études qui étudient l'effet des HDL ainsi que leurs mimétiques dans l'ICFEP [175-177]. Dans ce chapitre, nous allons faire un survol global sur les particules d'HDL ainsi que les études en lien avec la DD.

2.4.1 La structure et les sous-classes de HDL

Les HDL sont des petites particules denses et riches en

<i>Density (ultracentrifugation)</i>
HDL2 (1.063–1.125 g/mL)
HDL3 (1.125–1.21 g/mL)
<i>Size (GGE)</i>
HDL2b (9.7–12.0 nm)
HDL2a (8.8–9.7 nm)
HDL3a (8.2–8.8 nm)
HDL3b (7.8–8.2 nm)
HDL3c (7.2–7.8 nm)
<i>Size (NMR)</i>
Large HDL (8.8–13.0 nm)
Medium HDL (8.2–8.8 nm)
Small HDL (7.3–8.2 nm)
<i>Shape and charge (agarose gel)</i>
α -HDL (spherical)
Pre β -HDL (discoidal)
<i>Charge and size (2D electrophoresis)</i>
Pre β -HDL (pre β_1 and pre β_2)
α -HDL (α_1 , α_2 , α_3 and α_4)
Pre α -HDL (pre α_1 , pre α_2 , pre α_3)
<i>Protein composition (electroimmunodiffusion)</i>
LpA-I
LpA-I:A-II

lipoprotéines. Elles mesurent environ 5 à 10 nm de diamètre et leur densité varie entre 1.063 et 1.21 g/mL [178]. Une particule d'HDL est constituée d'un "core" hydrophobe contenant des esters de cholestérol et des triglycérides. Autour de ce noyau lipidique, nous retrouvons une couche de phospholipides, du cholestérol libre et d'apolipoprotéines de différents types. Ces dernières permettent à cette couche hydrophile d'être soluble dans le milieu plasmatique. Les HDL sont divisées en plusieurs catégories et sous-classes selon les différentes méthodes d'isolation ou de séparation (Tableau tiré de "Handbook of experimental pharmacology, volume 224, page 6"). En effet, la densité, la taille, la charge, la forme et la composition en protéines sont tous des facteurs qui différencient les sous-classes des HDL.

2.4.2 Les principaux composants des HDL

2.4.2.1 Les apolipoprotéines (Apo)

ApoA-I est la composante majeure des HDL. Secrétée par le foie et l'intestin, elle constitue environ 70% du total en protéines des HDL [179]. Plusieurs rôles des HDL sont assurés par la présence de l'apoA-I elle-même. Par exemple, l'activation de la lécithine/cholestérol acyltransférase (LCAT), l'interaction avec les récepteurs cellulaires ainsi que de multiples activités anti-athérogéniques sont médiés par l'apoA-I. Chez l'humain, l'apoA-I contient 243 acides aminés (a.a). Dans la circulation, l'apoA-I contient 8 hélices alpha amphipatique, 22 a.a. et deux répétitions de 11 a.a. L'apoA-I peut également être retrouvée dans les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL).

ApoA-II est la deuxième apolipoprotéine la plus abondante dans les HDL après l'apoA-I. Secrétée par le foie et l'intestin, elle constitue environ 20% du total de protéines de ces particules. L'apoA-II est plus hydrophobe que l'apoA-I. Dans la circulation, l'apoA-II est retrouvé sous forme d'un homodimère composé de deux chaînes de polypeptides identiques liées par un pont disulfure à la position 6 [180].

Les HDL contiennent d'autres apolipoprotéines à un moindre pourcentage. Ainsi, nous retrouvons l'apoA-IV, l'apoC-I, l'apoC-II, l'apoC-III, l'apoC-IV, l'apoD, l'apoE, l'apoF, l'apoH, l'apoJ, l'apo-LI et l'apoM [181]. Chacune de ces apolipoprotéines apporte aux HDL des fonctionnalités additionnelles telles que l'inhibition de l'enzyme de transfert de l'ester de

cholestérol (CETP), la liaison aux récepteurs des LDL, l'activation et l'inhibition de la lipase lipoprotéique ainsi que des propriétés structurelles et fonctionnelles diverses [181].

2.4.2.2 Les enzymes

LCAT: la LCAT est une enzyme très importante puisqu'elle catalyse l'estérification du cholestérol libre en cholestérol estérifié. Environ 75% de l'activité plasmatique de la LCAT est associée aux HDL. Généralement, elle se retrouve associée à l'ApoD [182]. Le gène de la LCAT est surtout exprimé au niveau du foie mais moindrement au niveau du cerveau et des testicules.

Les paraoxonases (PON), divisés en trois types (PON1, PON2 et PON3), sont exclusivement associées aux HDL. Synthétisées au niveau des reins et du colon, PON1 est une lactonase calcium-dépendante. Par son activité catalytique, PON1 hydrolyse l'homocystéine thiolactone. PON2 est plutôt intracellulaire, elle hydrolyse les substrats des organophosphorés et des esters de l'acide carboxylique aromatique. PON3 possède les mêmes fonctions lactonases que PON1 [183].

PAF-AH : "Platelet-activating factor acetyl hydrolase" aussi nommée "lipoprotein-associated phospholipase A2 (LpPLA2) est une enzyme N-glycosylée, calcium-indépendante, qui dégrade le facteur d'activation de plaquettes (PAF) et le transforme en lyso-PAF biologiquement inactif [184]. Cette enzyme clive les substrats de phospholipides pro-inflammatoires.

GSPx-3 est une glutathionne peroxydase qui protège contre l'oxydation causée par les peroxydes d'hydrogène, les lipides peroxydés et les hydro-péroxydes organiques. Synthétisée dans le foie, le cœur, les reins, les poumons et le placenta, la GSPx-3 est associée aux HDL et est responsable de leurs effets anti-oxydants [185].

2.4.2.3 Protéines de transfert de lipides

PLTP : protéine de transfert des phospholipides. Associée aux HDL, elle peut les convertir en plus grandes ou plus petites particules. Le PLTP joue également un rôle dans le transport des phospholipides extracellulaires et peut se lier aux lipopolysaccharides (LPS). Elle contient plusieurs sites de glycosylation et est stabilisée par une liaison disulfure [181].

CETP : La protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) permet le transfert bidirectionnel du cholestérol estérifié versus des triglycérides entre les HDL et les LDL et/ou VLDL. Elle peut également avoir une activité de transfert de phosphatidylcholine entre ces particules [186]. L'inhibition de la CETP entraîne une diminution des niveaux LDL et une augmentation du taux d'HDL [187].

2.4.2.4 Protéines diverses

SAA : Les protéines amyloïde A du sérum (SAA) sont secrétées à la suite d'une réponse inflammatoire aigue. Produit principalement par le foie, le SAA comporte 3 isoformes : SAA1, SAA2 et SAA4. Le SAA1 est l'isoforme qui s'associe de préférence aux HDL [188].

α -1 antitrypsine est un inhibiteur de sérine protéase exclusivement présent sur les HDL en circulation. Elle joue un rôle important dans la régulation de voies inflammatoires, de dégradation de la matrice extracellulaire et dans l'angiogenèse [189]. Plusieurs autres inhibiteurs de sérine protéases ont été retrouvés associés aux HDL.

2.4.2.5 Les lipides :

Plusieurs composantes lipidiques peuvent se retrouver au niveau des HDL. Les phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycérol...), les sphingolipides (sphingomyéline, sphingosine 1 phosphate S1P...), les lipides neutres (esters du cholestérol, cholestérol libre, diacylglycérides, triacylglycérides) et les acides gras libres constituent la plus grande partie de ces lipides [190].

Donc, les particules d'HDL sont très hétérogènes et peuvent être associés à une panoplie de protéines et de lipides qui leur donnent des fonctions spécifiques différentes et peuvent varier d'une personne à l'autre [191, 192]. Leurs effets pléiotropes sont alors dû aux différentes composantes de ces particules qui les rendent de plus en plus intéressantes à étudier et à explorer.

2.4.3 La formation de la plaque et le rôle des lipoprotéines dans le transport du cholestérol

Tout d'abord, des quantités de cholestérol plasmatique élevées induisent l'infiltration des lipoprotéines de faible densité (LDL) chargés de cholestérol (LDL-C) en dessous de la monocouche endothéliale ce qui crée un milieu inflammatoire. Un apport important de monocytes se différenciant en macrophages est alors médié par des substances chimiotactiques telles que le MCP-1 (monocytes chemo attractant protein-1) [193]. Plusieurs éléments inflammatoires (tel que les cytokines TNF- α , IL-6...) et oxydants (ROS) contribuent à l'oxydation des LDL et au recrutement massif de cellules inflammatoires vers la plaque. Les macrophages engorgés de LDL oxydés deviennent des cellules spumeuses et la plaque commence à s'élargir de plus en plus. En même temps, une prolifération de cellules musculaires lisses survient, une sécrétion de différentes protéases et un remodelage de la matrice extracellulaire forment ce qu'on appelle la chape fibreuse autour du noyau lipidique de la plaque [194]. La stabilité de la plaque dépend de l'intégrité de cette chape fibreuse. Lorsque cette dernière est dégradée par les différentes protéases, la plaque se rompt et son contenu est exposé à la lumière du vaisseau sanguin. La rupture de la plaque induit un recrutement important des plaquettes et des cellules inflammatoires. Cet amalgame bouche alors l'artère et forme ce qu'on appelle un thrombus [195].

Tel que décrit plus haut, l'élévation des quantités de LDL-C constitue l'élément déclencheur principal de la formation de la plaque. Le transport de cholestérol du foie vers les tissus périphériques se fait via les LDL. Cependant, le chemin inverse, c'est à dire le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie se fait via les HDL. Ce phénomène est appelé le transport inverse du cholestérol (RCT) et il s'agit du mécanisme le plus connu des HDL dans la réduction de l'athérosclérose. En effet, la première étape du RCT (figure 4) commence par un efflux (une sortie) de cholestérol de la membrane cellulaire des transporteurs appartenant à la famille ABC (ABCA1 et ABCG1) et/ou les récepteurs scavengers de la classe B (SR-B1) [196]. Différents "accepteurs" de cholestérol sont impliqués dans cette phase. Les particules pré β -HDL (qui sont les moins riches en lipides parmi les HDL) acceptent le cholestérol libre et les phospholipides sortant de la cellule via le transporteur ABCA1. Une interaction entre l'apoA-I des pré β -HDL et l'ABCA1 est nécessaire pour déclencher ce processus. Ces particules

pré- β -HDL subissent une maturation et un enrichissement en phospholipides et en cholestérol estérifié (via l'implication de la LCAT) pour devenir des HDL-3 puis des HDL-2 de plus en plus grosses et matures [197]. Un autre accepteur de cholestérol, soit les HDL sphériques matures, reçoit un efflux de cholestérol via le récepteur SR-B1. De la même façon, ces particules d'HDL continuent à s'enrichir en lipides et en cholestérol jusqu'à leur arrivée au niveau hépatique. Le dernier transporteur impliqué dans l'efflux de cholestérol avec un moindre pourcentage est le ABCG1. Ce dernier participe à l'enrichissement des α -HDL matures avant que ceux-ci se dirigent vers le foie pour la captation du cholestérol. À cette étape du processus, le récepteur SR-B1 des hépatocytes capte le cholestérol des HDL sans internalisation (endocytose) ni dégradation de la particule d'HDL [198]. Il s'agit de la voie la plus importante pour la décharge du contenu en cholestérol des HDL dans le foie. Les particules de type HDL ayant sur eux des molécules d'apo-E possèdent une bonne affinité pour le récepteur des LDL (LDL-R). Il s'agit alors d'une deuxième voie de captation du cholestérol par le foie. La dernière voie de captation récemment connue se fait à travers le récepteur purinergique (P2Y13R) des cellules hépatiques [199]. Contrairement à la voie SR-B1, une internalisation de la particule HDL par endocytose à l'intérieur de la cellule est nécessaire pour compléter le processus de captation du cholestérol. Des agonistes de P2Y13R ont montré un meilleur efflux de cholestérol *in vitro* chez la souris [199].

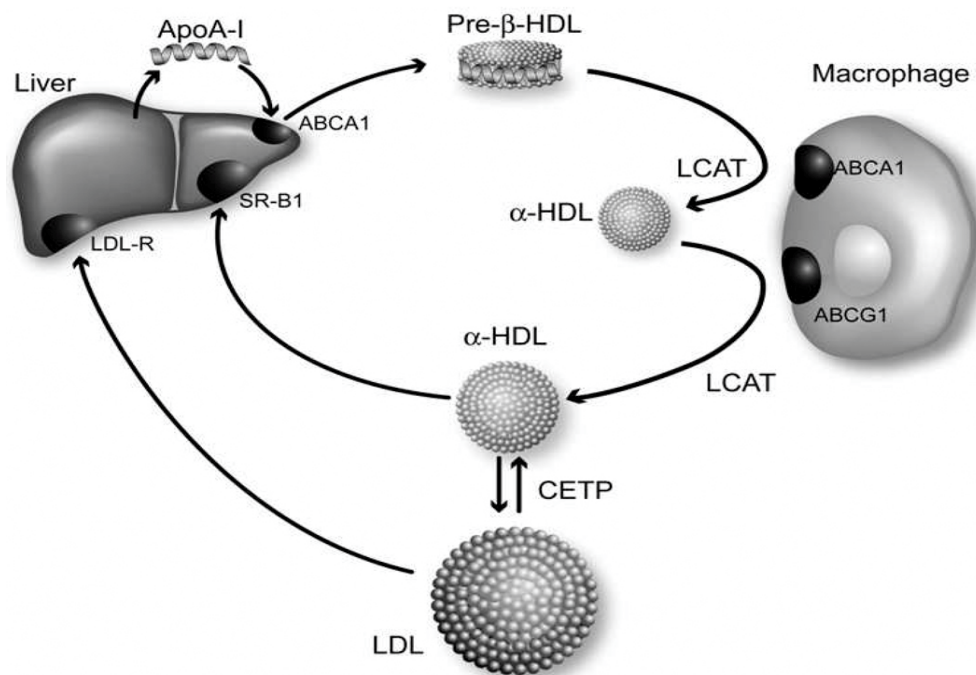


Figure 4. Schéma simplifié du transport inverse du cholestérol. Tiré de [196]

Donc, les HDL sont des particules indispensables dans le métabolisme des lipides grâce à leur rôle important dans l'efflux et la captation du cholestérol par le foie. La destination finale de ce cholestérol est l'élimination par la voie biliaire. Il est à noter que ces HDL possèdent d'autres effets importants comme anti-inflammatoires, anti-oxydants et anti-apoptotiques [200, 201].

2.4.4 Les effets anti-inflammatoires des HDL

Depuis l'année 1995, les chercheurs ont commencé à rapporter des effets anti-inflammatoires des HDL. En effet, ces derniers ont montré une diminution des niveaux d'ARNm et de protéines des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-Sélectine dans les cellules HUVEC (cellules endothéliales des veines ombilicales humaines) activés par des cytokines inflammatoires [202, 203]. Des études mécanistiques ont montré que cet effet anti-inflammatoire passe par l'inhibition des cascades découlant de la sphingosine kinase, du facteur de transcription NF- κ B et de la kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase) [204]. D'autres études cellulaires ont montré que les HDL lient les lipopolysaccharides inflammatoires réduisant ainsi leur contact avec les cellules endothéliales [205]. Des infusions de rHDL (HDL reconstitué contenant des phospholipides) chez des modèles de souris athérosclérotiques ont montré une réduction de la plaque athéromateuse à la suite d'une diminution des molécules d'adhésion VCAM-1 (ce qui diminue l'infiltration des cellules inflammatoires vers la plaque) ainsi que par la diminution de l'oxydation des LDL.

Ces effets anti-inflammatoires ont été rapportés dans de multiples études utilisant différentes molécules et formes d'HDL et d'apolipoprotéines [192].

2.4.5 Les effets anti-oxydants des HDL

Les HDL possèdent des effets anti-oxydants. En effet, grâce à la diminution de l'oxydation des LDL, les HDL diminuent le stress oxydant [206, 207]. Aussi, la présence de plusieurs protéines sur les HDL, tel que décrit plus haut, donne aux HDL la capacité d'augmenter l'activité de la eNOS et de réduire ainsi le stress oxydant grâce à l'effet des oxydes nitriques (NO) [192]. Les HDL peuvent inactiver l'effet des phospholipides oxydés par

l'enzyme PAF-AH qui se trouve associée à ces particules. Les HDL sont également capable d'inactiver les acides gras oxydés tel que l'acide hydroperoxyoctadiénoïque et l'acide hydroperoxyéicosatétraénoïque qui peuvent se retrouver sur les LDL [207]. Plusieurs études ont montré un effet anti-oxydant des HDL ou de l'apoA-I par l'inactivation de l'enzyme pro-oxydante, la NADPH oxydase [208-210].

Donc, ces effets anti-inflammatoires et anti-oxydants ont été rapportés dans de multiples études utilisant différentes molécules et formes d'HDL et d'apolipoprotéines [175, 211]. En effet, les HDL reconstitués sont souvent faits à partir de mimétique de l'ApoA-I et de phospholipides.

2.4.5 Les différentes stratégies d'augmentation des niveaux des HDL

Étant donné que les HDL ont été inversement corrélées avec les maladies cardiovasculaires, il serait intéressant d'utiliser des stratégies visant à augmenter les niveaux d'HDL dans l'organisme. Voici donc un résumé des différentes façons par lesquelles les niveaux d'HDL peuvent être augmentées :

2.4.5.1 Les habitudes de vie :

Les études ont montré que les niveaux des HDL peuvent être affectés par les habitudes de vie. En effet, les lignes directrices canadiennes recommandent de l'exercice de 30 à 60 minutes, 3 à 4 fois par semaine. L'étude (HERITAGE) a montré une augmentation d'environ 3% de niveau d'HDL chez une population de personnes normo-lipidiques [212]. Le tabagisme, un des facteurs de risque important des maladies cardiovasculaires, a été associé à une baisse des taux d'HDL ainsi qu'une augmentation du stress oxydant. L'arrêt du tabagisme a été analysé dans une méta-analyse comprenant 24 études différentes. L'augmentation des HDL suite à cette cessation tabagique variait de 0.01 à 0.32 mmol/L [213].

La diète quotidienne pourrait aussi affecter les niveaux de HDL. La consommation de nourriture riche en acide gras polyinsaturés (comme le saumon par exemple) est recommandée. En effet, une augmentation d'environ 8% des niveaux des HDL a été remarqué chez des patients hyper-lipidémiques traités avec des acides gras oméga-3 [214].

2.4.5.2 La modification génétique

L'injection d'un adénovirus surexprimant l'ApoA-I humaine chez un modèle de souris C57BL/6 a été récemment étudié. Ce virus a permis l'augmentation d'environ 80% de la quantité d'HDL mesurée dans le sang. Les autres particules de LDL, ILDL et VLDL n'étaient pas changées significativement dans ce modèle [215].

2.4.5.3 Les médicaments pharmacologiques

La niacine :

L'administration de l'acide nicotinique (niacine) augmente de façon importante les HDL. En effet, la niacine réduit significativement les taux de LDL-C, des triglycérides et de la lipoprotéine (a) (Lp-a). En contre balance, elle augmente les HDL-C d'environ 7% à 30% [216]. Des études sur la sécurité et l'efficacité de la niacine ont montré une hausse de 17% et 23% des HDL-C chez des patients hypercholestérolémiques traités avec 1000 et 2000 mg/jour de Niaspan[®], respectivement. Toutefois, les effets secondaires importants que ces médicaments engendrent (troubles gastro-intestinaux, hémorragies...) ont remis en question la pertinence de l'utilisation de ces médicaments [217]. Il est à noter que les niacines sont contre-indiquées chez les patients ayant une atteinte hépatique ou des transaminases élevées.

Les fibrates :

Les fibrates augmentent les niveaux d'HDL-C d'environ 10% à 15%. Leurs effets ont aussi été remarqués sur la baisse des LDL-C et des triglycérides. Les différents essais cliniques utilisant des fibrates ont montré une réduction d'environ 20% des infarctus du myocarde ainsi que de la revascularisation coronarienne [218, 219]. Une récente méta-analyse a montré une réduction du risque cardiovasculaire et des événements coronariens suite à l'utilisation des fibrates [220].

Les statines : Une hausse moyenne entre 5% et 11% du HDL-C pourrait être obtenue à la suite de l'administration de statines chez des patients dyslipidémiques [221]. En effet, l'étude STELLAR a évalué l'effet de différentes molécules de statines sur les niveaux des HDL-C. Le rosuvastatine (10-40 mg) a augmenté de 6% à 12% les HDL-C alors que l'atorvastatine (10-80

mg) l'a augmenté de 2% à 8%, 5% à 7% pour le simvastatine (10-80 mg) et 3% à 6% pour le pravastatine (10-40 mg) [221].

Les inhibiteurs de la CETP : Au moins quatre différentes molécules ont été développées à ce jour pour moduler l'effet de la CETP chez l'humain. Leur effet se traduit par une baisse du niveau des LDL-C et une hausse de celui des HDL-C. Le torcetrapib étant le premier qui a été testé, il augmente les HDL d'environ 72% et diminue les LDL-C de 24.9% [222]. Malgré les effets promoteurs que ce médicament a montré dans des études animales, chez l'humain le torcetrapib a augmenté la pression artérielle, l'aldostérone et les événements cardiovasculaires ce qui a mené à l'arrêt prématuré de l'étude ILLUMINATE [222].

Le deuxième médicament qui a été testé par la compagnie Roche, le dalcetrapib, a aussi subi un arrêt de l'étude DAL-OUTCOMES avant la fin prévue due à un manque d'effet significatif sur les critères primaires de l'étude. Les niveaux d'HDL-C ont augmenté d'environ 35% chez le groupe dalcetrapib alors que les changements au niveau des LDL-C étaient minimes [223]. Cependant, dans une étude pharmacogénomique effectuée sur l'ADN de sous-groupes de patients des cohortes dal-OUTCOMES et dal-PLAQUE-2, notre équipe de recherche a pu identifier un SNP (single nucleotide polymorphism) appartenant au gène de l'adénylate cyclase type 9 (ADCY9) qui divisait ces cohortes en sous-populations ayant des effets protecteurs versus délétères du médicament dépendamment de l'allèle du gène ADCY9 retrouvé chez les patients [224]. Ces résultats prometteurs ont ravivé l'hypothèse des thérapies basées sur la hausse des niveaux de HDL-C.

Le troisième inhibiteur de la CETP (iCETP) est l'evacetrapib. Trois mois après le début de son administration, ce dernier a augmenté drastiquement les taux d'HDL-C de 133.2% et diminué les LDL-C de 31%. Malgré ces changements significatifs favorables au niveau des lipoprotéines, l'effet de l'evacetrapib sur le nombre d'événements cardiovasculaires était neutre [225].

Le dernier iCETP est l'anacetrapib, qui a été développé par la compagnie Merck. Comme l'evacetrapib ce médicament a réussi à augmenter les HDL-C d'environ 100%. Cependant, le cholestérol non-HDL a diminué de 18%. Contrairement aux 3 études précédentes, l'anacetrapib a montré un effet bénéfique significatif, bien qu'il soit modeste (1% de différence avec le groupe

placebo), au niveau du premier événement coronarien majeur, du décès coronarien, d'infarctus du myocarde ou de revascularisation coronaire [226].

2.4.5.4 Les mimétiques des apolipoprotéines :

Les apolipoprotéines mimétiques sont des peptides synthétiques courts qui contiennent généralement au moins une hélice amphipathique [227, 228]. Ils sont souvent basés sur l'apoA-I, mais peuvent également contenir des séquences d'acides aminés (a.a.) et des motifs structuraux partagés par d'autres apolipoprotéines. Parmi les peptides mimétiques les plus connus, le 4F (D s'il est fabriqué à partir d'a.a. D ou L s'il est fabriqué avec des a.a. L). Le peptide 4F est basé sur la séquence du peptide 18A avec deux substitutions de phénylalanine (F) qui ont été effectuées sur la face hydrophobe du peptide. La phénylalanine est l'un des a.a. les plus hydrophobes et, avec les 2 substitutions, le peptide 4F contient au total 4 résidus phénylalanine, d'où son nom. Avec ses a.a. D, le D4F résiste à la protéolyse et est disponible par voie orale [229] (voir tableau I).

Tableau I. Différents peptides mimétiques des apolipoprotéines. Modifié de [196].

Apo Mimetic Peptides: Key Findings and Development			
Peptide	Primary Sequence	Key Findings	References
2F (18A)	Ac-DWLKAFYDKVAEKLKEAF-NH ₂	Failed to inhibit diet-induced atherosclerosis in mice	Wool et al, 2008 (Wool, Reardon et al, 2008)
4F	Ac-DWFKAFYDKVAEKFKEAF-NH ₂	Orally available and reduced atherosclerotic lesions in LDL receptor and apoE null mice.	Navabet al, 2009 (Navab, Ruchala et al, 2009)
5A	DWLKAFYDKVAEKLKEAF-P-DWAKAAYDKAAEKAKAA	Promoted cholesterol efflux by the ABCA1, ABCG1 transporters and athero protective in apoE null mice	Amar et al, 2010 (Amar, D'Souza et al, 2010)
ETC-642	PVLDLFRELLNELLEALKQKLK	Activates LCAT	Dasseux,2007 (Dasseux J-L, 2007)
ATI-5261	Ac-EVRSKLEEWFAAFREFAEEFLARLKSNNH ₂	Promoted ABCA1 dependent cholesterol efflux and atheroprotective in LDL receptor and apoE null mice	Bielicki, 2010 (Bielicki, Zhang et al, 2010)
apoE(130-149)	Ac-TEELRVRLASHLRKRLR-NH ₂	Inhibited eosinophilic airway inflammation, IgE production and cytokine release, improved pulmonary function	Yao et al, 2010 (Yao, Fredriksson et al, 2010)
E-2F	Ac-LRKLRKRLR-P-DWLKAFYDKVAEKLKEAF-NH ₂	Promotes hepatic uptake VLDL and LDL	Gupta et al,2005 (Gupta H, 2005)

Dans notre laboratoire, nous avons utilisé le peptide mimétique de l'apoA-I, ETC-642, qui était complexé avec des phospholipides et des sphingomyélines. Ce mimétique possède une séquence de 22 a.a. riche en phénylalanine et en alanine donnant à sa séquence un aspect hydrophobe assez important et augmentant ainsi son affinité aux lipides. Ce mimétique a montré des effets anti-inflammatoires comparables aux HDL [230]. Il est également plus résistant contre

la dégradation par les protéases. L'efficacité d'un traitement de cette classe pourrait être testé par plusieurs aspects. En effet, un des rôles principaux des HDL et leurs mimétiques c'est l'activation de la LCAT afin de favoriser l'engorgement de ces particules en esters de cholestérol afin de les éliminer par la voie biliaire. Un autre indicateur de cette efficacité est le pourcentage d'efflux de cholestérol que le sérum des groupes traités avec ces particules pourrait avoir comparé au groupe non-traité. Dans notre laboratoire, nous l'avons utilisé dans un modèle de SVA chez le lapin. C'est un modèle basé sur une exposition des animaux à une diète riche en cholestérol et en vitamine D2. Une amélioration de l'ouverture de la valve aortique ainsi qu'une diminution de la calcification de la valve ont été obtenus à la fin de l'étude chez le groupe traité comparé au placebo [231]. Nous avons par la suite utilisé un autre mimétique de l'apoA-I, le CER-522, dans le même modèle de SVA. Nous avons remarqué une amélioration de la SVA mais aussi de la DD après deux semaines de traitement avec le CER-522 [175].

2.4.6 Les HDL et leurs mimétiques dans la DD

Les maladies coronariennes sont considérées parmi les facteurs de risque du développement de la DD. Ainsi, environ 68% des patients atteints d'une ICFEP sont coronariens [129]. Les HDL sont inversement corrélées aux événements cardiovasculaires. Nous avons décrit plus haut le rôle important des HDL dans le transport inverse du cholestérol, la régression de la plaque, l'effet anti-inflammatoire et anti-oxydant que possède ces particules ainsi que leur mimétiques de l'apoA-I.

Plusieurs études animales et chez l'humain ont montré un effet potentiel des HDL dans la DD. En effet, les facteurs de risque de l'athérosclérose et de la DD se ressemblent. Un infarctus pourrait induire l'apoptose des cellules du myocarde engendrant ainsi une insuffisance cardiaque. Chez le rat souffrant de syndrome métabolique, les HDL ont montré une capacité d'améliorer la compliance vasculaire en diminuant la rétention de cholestérol au niveau des artères. Dans la même étude, les rats ont montré une amélioration du ratio E/A ce qui réfère à une amélioration de la DD [177]. Une augmentation de la production d'apoA-I par modification génique a amélioré la mortalité chez des souris LDLR^{-/-} post-infarctus. Une amélioration de la néo-vascularisation ainsi qu'une diminution de la zone d'infarctus ont été observées chez les souris traitées avec un adénovirus exprimant l'apoA-I humaine comparé au vecteur vide. Une

amélioration de la DD a été remarquée également [176]. La même équipe de recherche a aussi montré une amélioration de la fonction endothéliale par l'augmentation des cellules endothéliales progénitrices (EPC), une amélioration de la vascularisation et une amélioration de la DD chez des souris LDLR^{-/-} traitées avec le même adénovirus de l'apoA-I humaine [215]. Dans cette étude, les protéines impliquées dans le métabolisme calcique n'étaient pas altérées chez le groupe ApoA-I comparé au groupe contrôle.

Dans un contexte d'hypertension chez des patients, Miao et al investiguait sur le lien entre la dyslipidémie, la rigidité artérielle et la DD [232]. Ces chercheurs ont trouvé une corrélation inverse entre les quantités d'HDL-C, la rigidité artérielle et la DD (le ratio E/Em par échocardiographie). Une autre cohorte de 274 patients souffrant d'hypertension a montré une association inverse entre les quantités d'HDL-C, l'hypertrophie cardiaque (augmentation de la masse du ventricule gauche chez les femmes) et la DD (chez les deux sexes) [233]. Mis à part ces résultats, les HDL possèdent des effets anti-inflammatoires et anti-oxydants (tel que décrits dans les sections plus haut). En effet, dans notre laboratoire, nous avons démontré qu'une thérapie à base de mimétiques de l'apoA-I améliore la fonction diastolique via la diminution de l'inflammation (moins de macrophages) ainsi qu'une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes et de la fibrose périvasculaire [175]. Cependant, ces résultats ont été obtenus dans un modèle de SVA chez le lapin. La SVA peut causer la DD et l'effet du traitement obtenu pourrait être directement lié à la LVDD ou bien médié par l'amélioration de la SVA.

Le choix du modèle animal dans les études de développement de traitements contre la LVDD est un grand défi. La complexité de cette pathologie ainsi que l'implication de plusieurs voies moléculaires rendent la sélection d'un modèle adéquat très difficile. Nous avons écrit dans le chapitre suivant un article de revue décrivant les différents modèles animaux qui sont utilisés dans les études de DD. Ils sont divisés selon le facteur de risque associé à la pathologie ou bien par espèce animale. Chacun de ces modèles possède ses propres forces et faiblesses. Cibler le facteur de risque approprié à étudier est une étape très importante dans la sélection du modèle adéquat pour notre étude. Voici deux tableaux résumant les différents modèles animaux de la DD. La description plus détaillée de chacun de ces modèles se trouve dans l'article de revue inclus dans cette thèse.

Tableau II. Modèles animaux de dysfonction diastolique expérimentale, leurs forces et leurs faiblesses classifiés selon le facteur de risque approprié.

Facteur de risque	Modèle	Avantages du modèle	Faiblesses du modèle
Hypertension	Rats SHR	Hypertension progressive, bon modèle chronique, pas de chirurgie.	- Résulte d'une rétention hydro-sodique.
	Rats Dahl-Salt Sensitive		- Développe l'hypertension très tôt.
	Agonistes Ang II	Modèle non invasif avec bonne reproductibilité.	- Génétiquement modifié, plus cher.
	TAC (souris, rats, lapins, porc...)	LVDD due seulement à la surcharge de pression.	- Beaucoup de mortalité avec des doses élevées.
Diabète	Souris db/db	Développement de diabète similaire aux humains	- Chirurgie, suivi très exhaustive.
	Streptozotocine	Peut facilement être combiné avec d'autres facteurs de risque.	- Moins reproductible.
Syndrome métabolique (hypertension, diabète et obésité)	Rats JCR: LA-Cp	- Syndrome métabolique comme les humains.	- Données échos moins claires.
	Rats Dahl.S-Z(fa/fa)	- développe la LVDD par plusieurs voies moléculaires.	- Difficile à cibler une étiologie
Dyslipidémie	Souris ApoE-/- et LDLr-/-	- Augmentation des taux de cholestérol comme chez l'humain.	- Développement de lésions cutanées difficiles à gérer.
	Lapin hyperchol	- Pas d'hypertension.	- Pas beaucoup de matériels biologiques pour l'ex vivo
		- Données échos facile à acquérir chez le lapin.	- LVDD coexiste avec la sténose valvulaire aortique et les maladies coronariennes.
		- Plus de matériel chez le lapin.	- Anticorps peu disponibles.
Vieillessement	Souris FVB et Rats Fisher 344	- Mime l'effet âge sur la LVDD comme l'humain.	- Long à réaliser généralement plus que 1 an.
		- hypertrophie plus chez les femelles comme l'humain.	- Risque élevé de maladies rénales.

Tableau III. Modèles animaux de la DD, leurs forces et leurs faiblesses selon l'espèce.

Espèce	Modèle	Avantages communs à l'espèce	Avantages spécifiques au modèle	Faiblesses communes à l'espèce	Faiblesses spécifiques au modèle
Souris	MI	<ul style="list-style-type: none"> - Peu dispendieux (prix, hébergement ...) - Bien développé (anticorps, tests ...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Ischémie isolée d'autres facteurs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Trop petit (peu de tissus, techniques difficiles ...) - Physiologie différente de l'humain (rythme cardiaque, électrophysiologie ...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Procédures difficiles. - Risque de mortalité post-chirurgicale élevé... - Suivi plus laborieux.
	TAC		<ul style="list-style-type: none"> - DD isolée de la sténose aortique et athérosclérose. 		<ul style="list-style-type: none"> - Certaines colonies difficilement obtenues
	Génotype modifié		<ul style="list-style-type: none"> - Identifier des voies mécanistiques spécifiques 		
Rat	MI	<ul style="list-style-type: none"> - Peu dispendieux. - Bien développé. - Plus grand que la souris (plus de tissus, techniques chirurgicales plus faciles...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Ischémie isolée d'autres facteurs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Plus faible disponibilité que pour les souris au niveau de modèles transgéniques ou knock out. - Résultats pas toujours reproduits chez l'humain. 	<ul style="list-style-type: none"> - Procédures difficiles. - Risque de mortalité post-chirurgicale élevé... - Suivi plus laborieux.
	TAC		<ul style="list-style-type: none"> - DD isolée de la sténose aortique. 		<ul style="list-style-type: none"> - Certaines souches difficilement obtenues
	Génotype spécifique		<ul style="list-style-type: none"> - Identifier des voies mécanistiques 		
Lapin	Hyperchol	<ul style="list-style-type: none"> - Plus gros que les précédents - Proche de la physiologie humaine. - Facile à manipuler. - Données échographiques claires 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de chirurgie. - Pathologie progressive 	<ul style="list-style-type: none"> - Plus dispendieux que le rat et la souris. - Moins développé du point de vue moléculaire (anticorps, génome ...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Coexistence de plusieurs pathologies.
	MI		<ul style="list-style-type: none"> - Ischémie isolée d'autres facteurs. 		<ul style="list-style-type: none"> - Procédure complexe.
	TAC		<ul style="list-style-type: none"> - DD isolée de la sténose aortique et athérosclérose. 		<ul style="list-style-type: none"> - Risque de mortalité post-chirurgicale élevé... - Réponses variées. - Suivi plus laborieux.
Porc, chien, Brebis	Enrobage de rein	<ul style="list-style-type: none"> - Pratique du point de vue technique. - Plus proche de l'humain. 	<ul style="list-style-type: none"> - Insuffisance rénale et hypertension. 	<ul style="list-style-type: none"> - Trop dispendieux comparé aux autres modèles. - Peu ou pas de diversité de lignées génétiques. 	<ul style="list-style-type: none"> -Chirurgies complexes.
	TAC		<ul style="list-style-type: none"> - DD isolée de la sténose aortique et athérosclérose. 		<ul style="list-style-type: none"> -Risque de mortalité post-chirurgicale élevé...

3. But principal et objectifs de la thèse

Le but principal de cette thèse est de tester l'effet des thérapies à base d'HDL sur la dysfonction diastolique. Nous avons alors émis l'hypothèse suivante : Les HDL améliorent la dysfonction diastolique du ventricule gauche via leurs effets pléiotropes anti-athérogéniques, anti-inflammatoires et anti-oxydants.

Pour répondre à notre hypothèse, deux objectifs ont été établis :

- 1- Le premier objectif de cette thèse de doctorat est de développer un modèle animal qui présente de la DD sans avoir une SVA concomitante. Cet objectif a nécessité une revue de littérature présentée dans le manuscrit en annexe de cette thèse. La validation du modèle animal est décrite dans le manuscrit #1 de la thèse.
- 2- Le deuxième objectif est de tester l'effet potentiel d'un mimétique de l'apoA-I sur la DD dans le modèle animal développé selon l'objectif 1. Nous avons répondu à cet objectif dans le manuscrit #2 de la thèse.

Chapitre II: Cardiac inflammation and diastolic dysfunction in hypercholesterolemic rabbits

Walid Nachar, MSc^{a,b}, Nolwenn Merlet, PhD^a, Foued Maafi, MSc^{a,b}, Yanfen Shi, MD^a, Téodora Mihalache-Avram, MSc^a, Mélanie Mecteau, MSc^a, Eric Rhéaume, PhD^{a,b} and Jean-Claude Tardif, MD^{a,b}

^aMontreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, QC, H1T 1C8, Canada

^bUniversité de Montréal, 2900 Edouard Montpetit Street, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

Corresponding author:

[REDACTED]

[REDACTED]

Contribution de l'étudiant au manuscrit #1

L'article qui suit comprend une bonne partie de mes travaux de doctorat. La majorité des expérimentations, l'optimisation des méthodes et protocoles, la compilation et l'analyse des résultats ainsi que la rédaction de l'article ont été effectuées par le premier auteur de l'article.

Les coauteurs ont principalement contribué au niveau de la conception et le suivi du protocole animal, les analyses échocardiographiques, la révision du manuscrit ainsi que par le partage de leurs connaissances.

Dr Nolwenn Merlet a contribué à la conception et le suivi du protocole animal. Foued Maafi a contribué au partage de ces connaissances ainsi que dans les expérimentations. Dr Yanfen Shi a effectué les échocardiographies. Téodora Mihalache-Avram et Mélanie Mecteau ont participé dans le suivi et les sacrifices des animaux. Dr David Busseuil a aidé à la conception et la réalisation du protocole animal. Finalement les Drs Éric Rhéaume et Jean-Claude Tardif ont dirigé et supervisé mes travaux.

Les analyses statistiques ont été faites par Madame Lucie Blondeau du service de biostatistique du Centre de Coordination des Essais Cliniques de Montréal (MHICC).

L'article est accepté avec révision par le journal PLOS ONE.

RÉSUMÉ

La dysfonction diastolique ventriculaire gauche (LVDD) est présente chez plus de 50% des patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Mis à part le nombre restreint de modèles animaux de la LVDD, les mécanismes impliqués dans cette pathologie demeurent partiellement inconnus. Dans une étude antérieure, nous avons caractérisé une LVDD dans un modèle de sténose valvulaire aortique (AVS) chez le lapin. L'objectif de cette étude est de développer un modèle de LVDD sans AVS. Des lapins blancs ont été exposés à une diète normale ($n = 8$) ou riche en cholestérol à 0.5% ($n = 9$). La diète a été arrêtée lorsque la valeur du ratio E/E' a dépassé la valeur moyenne + $2*SD$ de ce même ratio au début de l'étude. Les mesures détaillées de la structure et de la fonction cardiaques ont été évaluées par échocardiographie au départ ainsi qu'aux semaines 8, 12 et 14 à 20, le cas échéant. Des analyses histologiques et des expériences de RT-qPCR ont été effectuées sur des échantillons de VG. Le ratio E/E' des lapins hypercholestérolémiques était significativement plus élevé que les lapins control ($p < 0,05$) alors que la fonction systolique ainsi que l'aire de la valve aortique étaient comparables entre les groupes. Comparé au groupe control, les lapins hypercholestérolémiques ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm cardiaque du peptide natriurétique cérébral (Bnp), du Vcam1, du Mmp12 ainsi que du Nox2. Cependant, l'expression de l'ARNm de l'enzyme anti-oxydante, la superoxyde dismutase (Sod2) était diminuée chez ces lapins par rapport au groupe témoin. En conclusion, les lapins exposés à diète enrichi en cholestérol ont développé la LVDD accompagné par des signes d'inflammation cardiaque et de stress oxydant. Ce modèle de lapin pourrait être utilisé dans de futures études pour tester des traitements contre la LVDD.

ABSTRACT

Background: Left ventricular diastolic dysfunction (LVDD) is present in more than 50% of patients suffering from heart failure. LVDD animal models are limited and its underlying mechanisms remain largely unknown. Aortic valve stenosis (AVS) may cause LVDD, and we recently reported LVDD in an AVS rabbit model. Here we aimed to develop a rabbit model of LVDD without AVS. **Methods:** Rabbits were fed with a 0.5% cholesterol-enriched diet (n=9) or normal diet (n=8) until they developed LVDD defined by a mean \pm 2SD increase from baseline of the echocardiographic parameter E/Em ratio. Rabbits were then fed a 0.2% cholesterol-enriched diet for 4 weeks (average total diet duration: 20 weeks). Detailed cardiac structure and function measurements were assessed by echocardiography at baseline, weeks 8, 12 and 14 to 20, when applicable. Histological analyses and RT-qPCR were performed on LV samples. **Results:** Hypercholesterolemic diet induced LVDD with preserved systolic function and exempted of AVS, as shown by multiple echocardiographic parameters, including early filling mitral peak velocity and deceleration rate, Em/Am ratio and E/Em ratio (all $p<0.05$) and by increased cardiac mRNA expression of brain natriuretic peptide (*Bnp*). Cardiac mRNA expressions of *Vcam1*, *Mmp12*, *Mmp12/Timp1* and *Coll/Col3* ratios were also higher in these rabbits ($p<0.05$). Cardiac *Nox2* mRNA expression was increased in hypercholesterolemic rabbits whereas *Sod2* expression was reduced compared to control group. **Conclusion:** Rabbits fed with a cholesterol-enriched diet for an average period of 20 weeks developed LVDD with preserved systolic function and presented cardiac inflammation and oxidative stress and indications of cardiac fibrosis. This rabbit model may be used in future studies to test treatment strategies against LVDD.

Key words: Diastolic dysfunction; Rabbits; Hypercholesterolemic-diet; Lateral mitral E/Em ratio; Echocardiographic parameters

1. INTRODUCTION

More than 6 million and 100 thousand persons suffer from heart failure in US [1] and in Canada, respectively. Around 30 billion dollars are spent yearly in US, which includes the cost of hospitalizations, medications, and missed days of work [2]. Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF; typically considered as $EF \geq 50\%$) is present in more than 50% of heart failure cases [3]. The evaluation of diastolic function has become an integral part of a full echocardiographic study and the approach is described in the guidelines of the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging [4]. The main risk factors for heart failure and left ventricular (LV) diastolic dysfunction (LVDD) remain coronary heart disease, ischemia, hypertension, aortic valve stenosis (AVS) and diabetes [5]. Patients with LVDD are treated for the underlying causes but not for the pathology itself. Physiologically, LVDD is usually the result of impaired LV relaxation and increased LV chamber stiffness, which increase cardiac filling pressures. Cardiac fibrosis, LV hypertrophy, inflammation and oxidative stress are frequently reported in LVDD studies [6-8], but the understanding of cellular and molecular mechanisms related to LVDD are still not well understood. Animal models of LVDD are not abundant and more representative ones are needed. Besides transgenic ones, animal models of LVDD and HFpEF are usually developed according to risk factors, including age, hypertension, coronary artery disease, pulmonary hypertension, diabetes, kidney disease and valvular dysfunction. In this respect, we recently demonstrated that a mild AVS rabbit model, obtained by a 16-week period of 0.5% cholesterol-enriched diet

supplemented with vitamin D₂ (50 000 IU.day⁻¹), also developed LVDD [9, 10]. In this model, the correlations observed between LVDD and AVS highlighted the fact that AVS is one potential cause of LVDD development, but the direct consequences of the cholesterol-enriched diet were not explored [10]. Here we aimed to develop a simple and relevant rabbit lipid-mediated LVDD model, without the presence of AVS or any surgical or genetic modification. Assessment of LVDD was done by serial echocardiography and by specific molecular analyses on cardiac mRNA gene expression and immunohistochemistry.

2. METHODS

Animals

Animal care and procedures complied with the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Montreal Heart Institute Research Center ethics committee for animal research. New-Zealand White rabbits (3.0±0.1 kg, aged 12-13 weeks) were fed with a 0.5% cholesterol-enriched diet (Teklad Global Rabbit Diet 2030, *Harlan Laboratories*, Madison, WI, USA) (n=9) for 20 weeks or until they developed LVDD defined by serial echocardiography measurements as a mean±2SD increase of lateral E/Em ratio in comparison to baseline. Rabbits were then fed for 4 weeks with a 0.2% cholesterol-enriched diet (Teklad Global Rabbit Diet 2030, *Harlan Laboratories*) to preserve animals from potential hepatic problems. The total period of diet was an average of 20 weeks. Control rabbits were fed a normal diet and matched for diet duration (n=8). At the end of the protocol, blood samples were obtained through the ear marginal vein under acepromazine tranquilization (1 mg/kg, i.m.). Rabbits were then sacrificed by

exsanguination under anaesthesia after cardiac arrest in diastole (2% lidocaine, 5-10 mL, i.v.). Then, the LV was removed, flushed with sterile saline, and stored for histological analyses (immersion-fixed in 10% buffered formalin at 4 °C for 24 h and embedded in paraffin) and molecular studies (snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C).

Echocardiography

Examinations were carried out with a phased-array probe 10S (4.5 ~ 11.5 Mega Hertz) using a Vivid 7 Dimension system (*GE Healthcare Ultrasound*, Horten, Norway). Intramuscular injections of ketamine (35 mg/kg) and midazolam (0.9 mg/kg) were used for sedation. Complete echocardiography-Doppler examinations were performed at baseline, weeks 8, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20 to assess left ventricle (LV) morphology, LV systolic and diastolic functions and aortic valve function parameters. Procedure was done as previously described [10].

RNA extraction and cDNA synthesis

Left ventricular tissue (200 to 400 mg) was homogenized in Trizol buffer using “PowerGen125” homogenizer (*Fisher Scientific*, ON, Canada) for approximately 60 seconds. Homogenates were then aliquoted into 5 tubes and one of the aliquote was used to extract total RNA using Qiagen miRNeasy Kit (*Qiagen*, ON, Canada). The quality and quantity of total RNA was assessed using Agilent RNA 6000 Nano Kit for Bioanalyzer 2100 System (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). RNA integrity numbers (RIN) were higher than 8/10 for all samples. One (1) µg of total RNA were used to generate first strand of complementary DNA (cDNA) using High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit with RNase inhibitor (*Applied Biosystems*, CA, USA) in a final reaction volume of 20 µl according to manufacturer's instructions.

mRNA quantification using real-time PCR

Quantitative RT-PCR experiments were performed using Bio-Rad CFX384 thermal cycler. Final reaction volume was 10 µl and composed of 1X SyberGreen (GoTaq® qPCR Master Mix, *Promega Corporation*, Madison, WI, USA or Perfecta SyberGreenFastMix®, ROX™, *Quanta BioSciences*, Gaithersburg, MD, USA), 0.4 µM of forward and reverse primer, and 2.16 ng of cDNA template. Initial denaturation was made at 95°C for 5 min. Amplification was then performed during 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 sec and annealing/extension at 60 °C for 1 min. At the end, a dissociation curve was produced to analyze and confirm the specificity of the amplification by observation of a single peak in the curve. Standard curves of five to seven points were produced for each gene to transform sample's Cts to relative expression values. Amplification efficiencies were calculated according to Pfaffl's method [11]. All samples were run in duplicate and the mean values were used for calculations. Relative quantities of the unknown samples were normalized against the normalization factor (NF) which was calculated from the geometric means of the expression of the best two reference genes (*Gapdh*, *Sdha* and *Hprt1*) as selected by geNorm. Primers sequences are presented in supplementary data (Table S1).

Histology and immunohistochemistry staining

Ventricles were harvested following sacrifice and processed as previously described [9]. Ventricular transverse sections (8 µm) were stained with Masson's trichrome to assess LV

fibrosis. Macrophage content were detected by RAM-11 staining as previously described [10]. All pictures were taken at 10X or 20X magnifications (for RAM-11 and Masson's trichrome, respectively) using a computer-based digitizing image system using a light microscope (*Olympus BX41*, Richmond Hill, ON, Canada) connected to a digital video camera Q-Color3 (*Olympus*, Richmond Hill, ON, Canada) using Image Pro Plus version 9.2 (*Media Cybernetics*, Bethesda, MD, USA) for picture acquisition and analysis (5 pictures/ LV section).

Dihydroethidium (DHE) staining

Superoxide production, a marker of oxidative status, was examined by staining fresh tissue sections with DHE as previously described [6], and with DAPI (*Sigma-Aldrich*, #D9542) as counterstaining. Dihydroethidium is oxidized in the presence of superoxide and form fluorescent ethidium, which was detected by fluorescence with a Zeiss LSM-710 inverted confocal laser scanning microscope equipped with 410/502 nm excitation/emission filters. As a negative control, sections were incubated with 300 U/mL of superoxide dismutase (SOD, *Sigma-Aldrich* # S5395) before staining with DHE; fluorescent signal was abolished in comparison with other samples. A 20X magnification with a 0.8 zoom-out was used for pictures acquisition. The analysis was performed with Image Pro Plus version 9.2 (*Media Cybernetics*) on 4 pictures/ LV section. Fluorescence was quantified by counting the pixels in correspondent image fields and normalizing to DAPI staining.

Biochemistry

C-Reactive Protein (CRP) levels were measured by ELISA using commercial kit specific to rabbits (GenWay Biotech, San diego, CA; GWB-9BF960). Serum of rabbits at end of the protocol was diluted (1:500) and processed following manufacturer's instructions.

Total and free cholesterol were measured on serum samples by OD method using commercial kit (*Wako* #439-17501 and #435-35801, respectively). Esterified cholesterol levels were obtained by subtracting free cholesterol from total cholesterol.

Statistics

Continuous variables are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). LVDD parameters and LV hypertrophy parameters were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA) model including one factor for time, one factor for group and the group-by-time interaction. When the interaction was significant, groups' comparison at each time point followed. Biochemical, histological and molecular results obtained at the end of the protocol were compared between the groups by a t-test using the Satterthwaite or Pooled method, where appropriate. Statistical analyses were performed using SAS version 9.2 or higher (*SAS Institute Inc.*, Cary, NC, USA). All analyses were conducted at the 0.05 significance level.

3. RESULTS

Rabbits were fed a 0.5% cholesterol-enriched diet until a mean \pm 2SD increase of lateral E/Em ratio in comparison to baseline was observed. According to this cut-off value, 3 of the 9 hypercholesterolemic rabbits were diagnosed with LVDD after a 15-week diet period,

2 rabbits after 16 weeks and 1 rabbit after 20 weeks of diet. Three rabbits died before meeting this criterion (at weeks 14, 16 and 18, respectively). According to clinical signs, we hypothesize that this was caused by hepatic problems due to high cholesterol levels.

The serum levels of total, free and esterified cholesterol at the end of the protocol were markedly elevated in rabbits exposed to high cholesterol diet compared to normal group (Table 1). Especially, total cholesterol was increased by 24.8 mmol/L compared to normal diet group ($p=0.032$), corresponding to a 38-fold increase. However, the ratio between free and esterified cholesterol was similar between both diets ($p=0.944$).

3.1. High cholesterol diet induces progressive diastolic dysfunction with preserved systolic function in rabbits

Progression of LV diastolic dysfunction parameters was evaluated by echocardiography-Doppler at baseline (week 0) and at weeks 8, 12 and 14 to 20. From pulsed wave Doppler imaging of transmitral inflow, peak-velocity of early LV filling (E-wave) was significantly increased with hypercholesterolemic diet ($p<0.001$) but not in rabbits fed with a normal diet ($p=0.997$), resulting in a significant over-time difference between the two diets ($p<0.001$; Figure 1A). Groups' comparisons at each time point indicate that this difference was significant as soon as 14 weeks of hypercholesterolemic diet. A similar pattern was observed for E wave deceleration rate (time*diet interaction: $p=0.003$; Figure 1B). Based on tissue Doppler imaging of the lateral mitral annulus, the two indices of LV filling E/Em and Em/Am ratios were calculated. During the 20 weeks of high cholesterol diet, rabbits showed an increase of E/Em ratio ($p<0.001$; Figure 1C) and a decrease of Em/Am ratio ($p=0.002$; Figure 1D) whereas no change was observed with normal diet ($p=0.983$ and

$p=0.241$, respectively), resulting in significant over-time difference between groups ($p<0.001$ and $p=0.015$, respectively). Also, the differences between the durations of mitral A-wave and pulmonary Ar-wave from both left and right sides were significantly more negative in hypercholesterolemic rabbits ($p<0.001$, both; Figures 2A and 2B) compared to normal rabbits ($p=0.528$ and $p=0.336$, respectively) resulting in significant over-time differences between groups ($p<0.001$, both). Finally, the left atria dimension during diastole (LADd) was measured and indexed to rabbit body weight (LADd/BW). Whereas this index slightly, but significantly, decreased over-time in normal group ($p<0.001$), it markedly increased over-time in hypercholesterolemic rabbits ($p<0.001$), resulting in significant over-time difference between groups ($p<0.001$; Figure 2C). Taken together, these parameters are consistent with LVDD progression and increased left-sided filling pressures. While LVDD developed progressively over time, no significant changes were observed in LV systolic function parameters such as ejection fraction ($p=0.774$) and fractional shortening ($p=0.787$; Supplementary figure S1).

3.2. High cholesterol diet caused LV hypertrophy in rabbits

Left ventricular hypertrophy is usually observed in rabbit models with lipid-enriched diet and LV hypertrophy is generally present in LVDD pathology. Hypercholesterolemic rabbits showed an increase of LV mass indexed to body weight over time ($p<0.001$), while normal diet rabbit group did not show significant change over the study ($p=0.387$) resulting in a significant over-time difference between the two diets ($p<0.001$; Figure 3A). Groups' comparisons at each time point indicate that this difference is significant as soon as 14 weeks of hypercholesterolemic diet. Natriuretic peptides are considered as markers of

LVDD presence. In our study, hypercholesterolemic rabbits showed a significant increase of brain natriuretic peptides (*Bnp*) mRNA levels compared to normal group ($p=0.006$; Figure 3B). Cardiac mRNA level of atrial natriuretic peptide (*Anp*) was also increased but did not reach significance ($p=0.151$; Figure 3C).

3.3. Hypercholesterolemic rabbits did not develop AVS in comparison to normal group

Aortic valve area (AVA) was not significantly different between normal and hypercholesterolemic group at week 20 of diet as shown in Figure 4 (baseline: 24.3 ± 2.5 vs. 25.1 ± 3.9 mm²; $p=0.638$ and week 20: 26.1 ± 3.2 vs. 23.8 ± 7.0 mm²; $p=0.122$ in normal and hypercholesterolemic groups, respectively). Also, when compared to our previous study of hypercholesterolemic diet with vitamin D₂ addition [10], our rabbits without vitamin D₂ did not show any sign of aortic valve stenosis (supplementary data S2).

3.4. High cholesterol diet caused cardiac inflammation in rabbits

Serum CRP levels were numerically higher in hypercholesterolemic rabbits compared to normal group ($p=0.133$; Figure 5A). These rabbits also presented macrophage infiltration in LV as revealed by RAM-11 staining in LV sections ($27.2 \pm 7.1\%$ of LV area; Figures 5B and 5D) whereas no staining could be detected in normal rabbits (Figure 5C). Quantitative PCR analysis showed an increase of cardiac mRNA levels of vascular cell adhesion protein 1 (*Vcam1*, $p=0.030$; Figure 6A), matrix metalloproteinase 12 (*Mmp12*, $p=0.023$; Figure 6B), tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (*Timp1*, $p=0.087$; Figure 6C) and the ratio of *Mmp12* to *Timp1* ($p=0.022$; Figure 6D). Taken together, our rabbit model clearly develops cardiac inflammation after exposition to high cholesterol diet.

3.5. High cholesterol diet induced myocardial oxidative stress in rabbits

After an average period of 20 weeks of cholesterol-enriched diet, rabbits have shown a significant increase of cardiac mRNA levels of the subunit of NADPH oxidase enzyme complex *Nox2* ($p=0.021$; Figure 7A) and a decrease of type 2 superoxide dismutase antioxidant enzyme (*Sod2*, $p=0.031$; Figure 7B). Also, reactive oxygen species (ROS) generation was quantified in LV sections by the DHE method. Compared to normal group, DHE staining was numerically increased in hypercholesterolemic rabbits (25.6 ± 4.3 vs. $11.7\pm4.3\%$, $p=0.053$; Figure 7C).

3.6. Hypercholesterolemic rabbits presented indications of cardiac fibrosis initiation

Cardiac fibrosis was assessed by Masson's trichrome and Sirius red staining of LV sections and was similar between both diets ($p=0.595$ and $p=0.231$ respectively; Figure 8A). At the molecular levels, a trend to increased cardiac mRNA levels was observed for *Tgfb1* ($p=0.116$; Figure 8B) and *Coll* ($p=0.149$; Figure 8C) but not for *Col3* ($p=0.463$; Figure 8D). However, the *Coll* to *Col3* ratio was significantly increased in hypercholesterolemic rabbits in comparison to normal group ($p=0.026$; Figure 8E).

4. DISCUSSION

Diastolic dysfunction is a complex disease that involves different pathways [12]. The lack in our understanding of the molecular mechanisms behind the progression of this disease is mainly due to poor suitable animal model that demonstrate a representative diastolic dysfunction [13, 14]. Hypercholesterolemia is one of the main risk factor of coronary artery

disease but its role in LVDD has been underappreciated. Huang et al in 2004 published a rabbit model of systolic and diastolic dysfunction exposed to high cholesterol diet for 10 weeks [15]. However, few data are available from *in vivo* investigations and animal models are needed. In this context, a large animal model chronically exposed to three common comorbidities that associate with LVDD (*i.e.* hyperglycemia, hypercholesterolemia and hypertension) was recently published [16]. The present study aimed to develop a simple lipid-mediated LVDD rabbit model, without valvular dysfunction nor LV systolic dysfunction, using the tissue-Doppler parameter E/Em ratio as primary endpoint.

The physiology of diastolic function encompasses all processes involved in LV filling and includes both active processes (energy-dependent), including myocardial relaxation, and passive processes, such as loading conditions and myocardial compliance. Doppler echocardiography plays a central role in the evaluation of LV diastolic function [4]. In this study, we choose to weekly evaluate the mitral E/Em ratio and to define a mean \pm 2SD change or more, compared to baseline, as an indication of LVDD. Most of our rabbits met this criterion after a 15 or 16-week period of hypercholesterolemic diet. Presence of LVDD was then confirmed with other echocardiography parameters including increased mitral E-wave velocity, indicating altered LV relaxation, increased mitral E-wave deceleration rate, suggesting altered LV compliance, increased time difference between A-wave and Ar-wave durations, indicating higher LV end diastolic pressure, and increased indexed left atrial diameter, reflecting the cumulative effects of increased LV filling pressures over time. All together, these data strongly support the presence of LVDD with preserved systolic function in our hypercholesterolemic rabbits.

Inflammation has been reported as a key player in LVDD [17]. During the last few years, a few studies have supported the paradigm proposed in 2013 by Paulus and Tschöpe [18, 19], where systemic inflammation promotes coronary endothelial dysfunction [20], allowing myocardial leucocyte infiltration, inflammation and then fibrosis. These pathological features have all been observed in the lipid-mediated rabbit model presented in this study. First, hypercholesterolemic rabbits presented a pro-inflammatory state as documented by elevated levels of circulating CRP and by the presence of macrophages observed on LV sections. Inflammation was also supported by the increase in *Vcam1* mRNA expression in myocardium, an adhesion molecule responsible for the adhesion and initiation of transmigration of monocytes and neutrophils to and beneath the endothelium [21], suggesting endothelial dysfunction. Second, hypercholesterolemic rabbits showed increased myocardial oxidative stress as reported by an increase of mRNA levels of the pro-oxidant NADPH enzyme subunit and a decrease of the anti-oxidant enzyme Sod-2. This was accompanied by higher levels of ROS generation as shown by increased DHE staining. This increased oxidative stress state indicates cardiac cell dysfunction. Third, our hypercholesterolemic rabbits presented early signs of cardiac fibrosis as reported by qPCR experiments with a trend for increased mRNA levels of *Col1* and *Tgfb1*. However, these changes were not observed at the protein level since coloration of collagen deposit by Masson's trichrome did not show significant increase in rabbits LV sections. It may be due to the preliminary stage of the disease. Here, we can hypothesize that fibrosis is likely due to infiltrated monocytes that can secrete growth factor such as TGF- β and induce the conversion of fibroblasts to myofibroblasts, a cell phenotype that secrete more extracellular

matrix (ECM) for example collagens [22]. In this respect, our hypercholesterolemic rabbits showed increased mRNA levels of *Mmp12* and *Timp1*, suggesting a higher cardiac ECM remodeling. As MMP12 targets elastin, and TIMP1 inhibits ECM proteolysis and therefore results in ECM (mostly collagen) accumulation, these changes might be responsible for the increased myocardial stiffness (*i.e.* decreased myocardial compliance) contributing to LVDD.

Limitations

The study was initially conducted with 9 rabbits in the hypercholesterolemic group. Mortality obtained was of 33% which is considered high for this kind of study. It may be due to the long period of the diet. We also noticed a significant change over time of the AVA in normal and hypercholesterolemic group. However, when compared to our previous study where hypercholesterolemic rabbits were supplemented with vitamin D₂ and therefore developed mild-AVS [10], the decrease of AVA in this study is remarkably less important and can not be considered as significant AVS signs.

Cholesterol-fed rabbits are basically used for atherosclerosis studies. Our rabbits presented intimal atherosclerotic lesions in ascending aorta. This aspect may affect the results of future treatments targeting other risk factors behind LVDD progression.

CONCLUSION

We characterized a simple and reliable lipid-mediated LVDD rabbit model which has been validated with robust echocardiography parameters. This model presented pathological features classically observed in LVDD such as systemic and cardiac inflammatory state,

with increased oxidative stress and early signs of cardiac fibrosis as evaluated by molecular techniques. The advantage of detecting the degree of the disease (by E/Em ratio assessment) would be useful for future studies aiming to develop medications against LVDD and HFpEF.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the statistical analyses by Lucie Blondeau, MSc, at the Montreal Heart Institute Coordinating Center (MHICC). We also thank Francine Duval from Montreal Heart Institute (MHI) for echocardiographic data acquisition and analysis.

FUNDING

Dr. Tardif holds the Canada Research Chair in translational and personalized medicine and the Université de Montréal endowed research chair in atherosclerosis.

COMPETING INTEREST

Patents on the theme of HDL and both aortic valve stenosis and diastolic dysfunction were submitted by the Montreal Heart Institute and Drs Tardif and Rhéaume are mentioned as authors.

REFERENCES

1. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2018. **137**(12): p. e67-e492.
2. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association*. Circulation, 2011. **123**(8): p. 933-44.
3. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic*. JAMA, 2003. **289**(2): p. 194-202.
4. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. J Am Soc Echocardiogr, 2016. **29**(4): p. 277-314.
5. Khatibzadeh, S., et al., *Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis*. Int J Cardiol, 2013. **168**(2): p. 1186-94.
6. Murase, T., et al., *Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome*. Hypertens Res, 2012. **35**(2): p. 186-93.
7. Takatsu, M., et al., *Calorie restriction attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in a rat model of metabolic syndrome*. Hypertension, 2013. **62**(5): p. 957-65.
8. Westermann, D., et al., *Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 44-52.
9. Nachar, W., et al., *Optimisation of reference genes for gene-expression analysis in a rabbit model of left ventricular diastolic dysfunction*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89331.
10. Merlet, N., et al., *HDL mimetic peptide CER-522 treatment regresses left ventricular diastolic dysfunction in cholesterol-fed rabbits*. Int J Cardiol, 2016. **215**: p. 364-371.
11. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
12. Periasamy, M. and P.M. Janssen, *Molecular basis of diastolic dysfunction*. Heart Fail Clin, 2008. **4**(1): p. 13-21.
13. Horgan, S., et al., *Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction*. J Card Fail, 2014. **20**(12): p. 984-95.
14. Dubi, S. and Y. Arbel, *Large animal models for diastolic dysfunction and diastolic heart failure-a review of the literature*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(3): p. 147-52.

15. Huang, Y., et al., *Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 97-102.
16. Sorop, O., et al., *Multiple common comorbidities produce left ventricular diastolic dysfunction associated with coronary microvascular dysfunction, oxidative stress, and myocardial stiffening*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(7): p. 954-964.
17. Van Linthout, S. and C. Tschope, *Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both?* Curr Heart Fail Rep, 2017. **14**(4): p. 251-265.
18. Paulus, W.J. and C. Tschope, *A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(4): p. 263-71.
19. Kai, H., et al., *Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis*. Hypertens Res, 2005. **28**(6): p. 483-90.
20. Franssen, C., et al., *Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. JACC Heart Fail, 2016. **4**(4): p. 312-24.
21. Poher, J.S. and W.C. Sessa, *Inflammation and the blood microvascular system*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **7**(1): p. a016345.
22. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis*. J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 631-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1:

LVDD parameters assessed by pulsed wave and tissue Doppler echocardiography showing progression of the disease over time in rabbits fed with a normal diet (circles, n=5-8) or a hypercholesterolemic diet (squares, n=3-9). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Am: mitral annulus velocity during active atrial filling, E: peak velocity during early left ventricular filling, E-wave: early left ventricular filling, Em: mitral annulus velocity during early left ventricular filling, NS: non-significant.

Figure 2:

Pulsed wave Doppler at pulmonary venous levels. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. A-Ar durations: mitral A-wave (active atrial filling) duration *minus* (left or right) pulmonary venous reversed atrial flow duration, LADd: smallest left atrium dimension at end cardiac diastole, BW: Body weight, NS: non-significant.

Figure 3:

Cardiac hypertrophy as assessed by echocardiography and qPCR experiments. (A): Left ventricle (LV) mass normalized to body weight (BW) measured by echocardiography. (B) LV brain natriuretic peptide mRNA as measured by qPCR. (C) LV atrial natriuretic peptide mRNA as measured by qPCR. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, NS: non-significant.

Figure 4:

Aortic valve area (AVA) is not significantly different between groups in any time point of the study as measured by echocardiography. NS: non-significant.

Figure 5:

Inflammation markers in rabbits assessed by immunohistochemistry and biochemistry analysis. (A): C-reactive protein levels in rabbits' serum quantified by ELISA at the end of the study. (B): Macrophage percentage in LV wall as revealed by RAM-11 antibody. (C): RAM-11 staining in normal rabbit, representative photo taken at 10x magnification. (D): RAM-11 staining in hypercholesterolemic rabbit, representative photo taken at 10x magnification.

Figure 6:

Inflammatory markers quantified by qPCR in LV homogenates after sacrifice. (A): *Vcam1* mRNA, (B): *Mmp12* mRNA, (C): *Timp1* mRNA, (D): *Mmp12/Timp1* mRNA ratio. * $p \leq 0.05$.

Figure 7:

Oxidative stress status in rabbits. (A): *Nox2* mRNA levels in LV homogenates as quantified by qPCR, (B): *Sod2* mRNA levels in LV homogenates as quantified by qPCR, (C): % of DHE positive staining normalized to DAPI staining. * $p \leq 0.05$.

Figure 8:

Cardiac fibrosis genes assessed by qPCR and histology marker of collagens fibers in LVs. (A): Masson's trichrome and Sirius red coloration quantified in LV sections at 10x magnification. (B):

Tgfb1 mRNA, (C): Collagen I mRNA, (D): Collagen III mRNA, (E): *Col1/Col3* mRNA ratio.

* $p \leq 0.05$.

Supplementary Figure S1:

Systolic parameters were stable between groups over time as assessed by echocardiography. EF: ejection fraction. FS: Fractional shortening.

Supplementary Figure S2:

AVS parameters are less affected by high cholesterol diet only than by high cholesterol diet with presence of vitamin D₂ (rabbits with vitamin D₂ reported in our previous study [9]). AVA: Aortic valve area, G_{mean} : Mean gradient cross AV flow, G_{peak} : Peak gradient cross AV flow.

FIGURES AND TABLES

Table 1. Total, free and esterified cholesterol measured in rabbits' serum at the end of the study.

	Normal diet group	High cholesterol diet group	<i>p</i> -value
Total cholesterol (mmol/L)	0.66 ± 0.10	25.5 ± 4.7	0.003
Free cholesterol (mmol/L)	0.25 ± 0.06	9.7 ± 2.6	0.015
Esterified cholesterol (mmol/L)	0.40 ± 0.05	15.8 ± 2.9	0.003

Figure 1

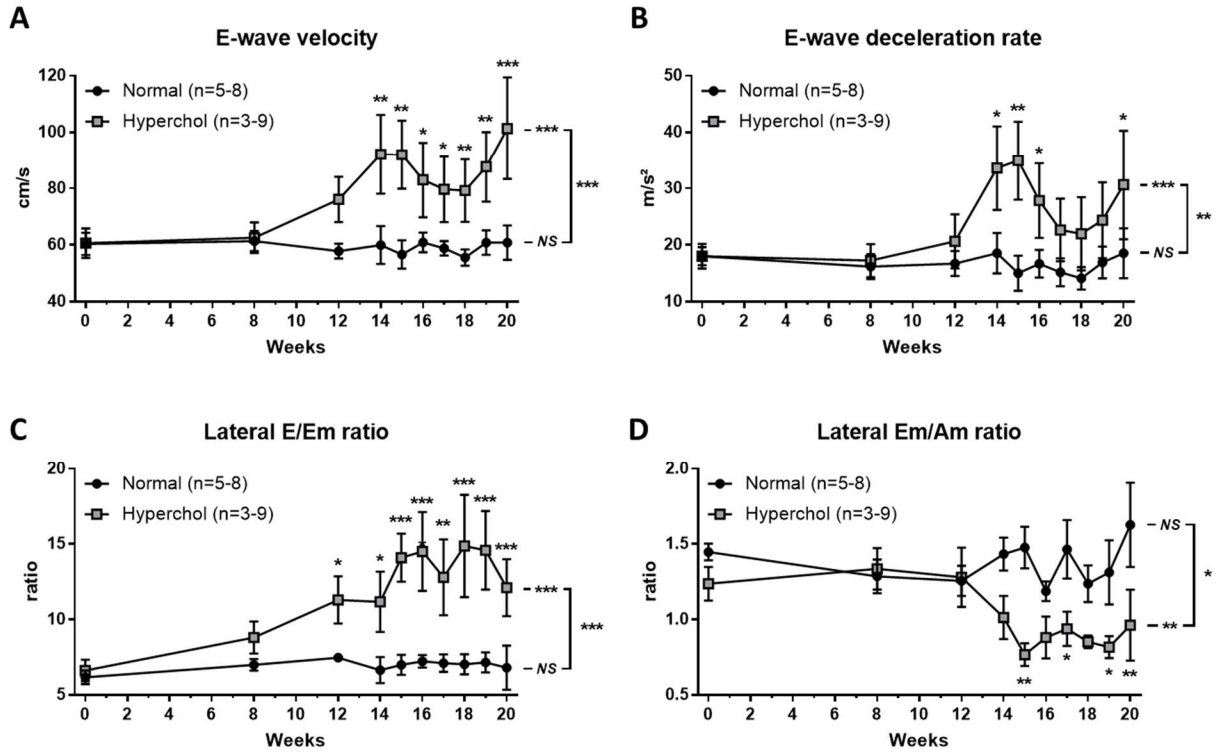


Figure 2

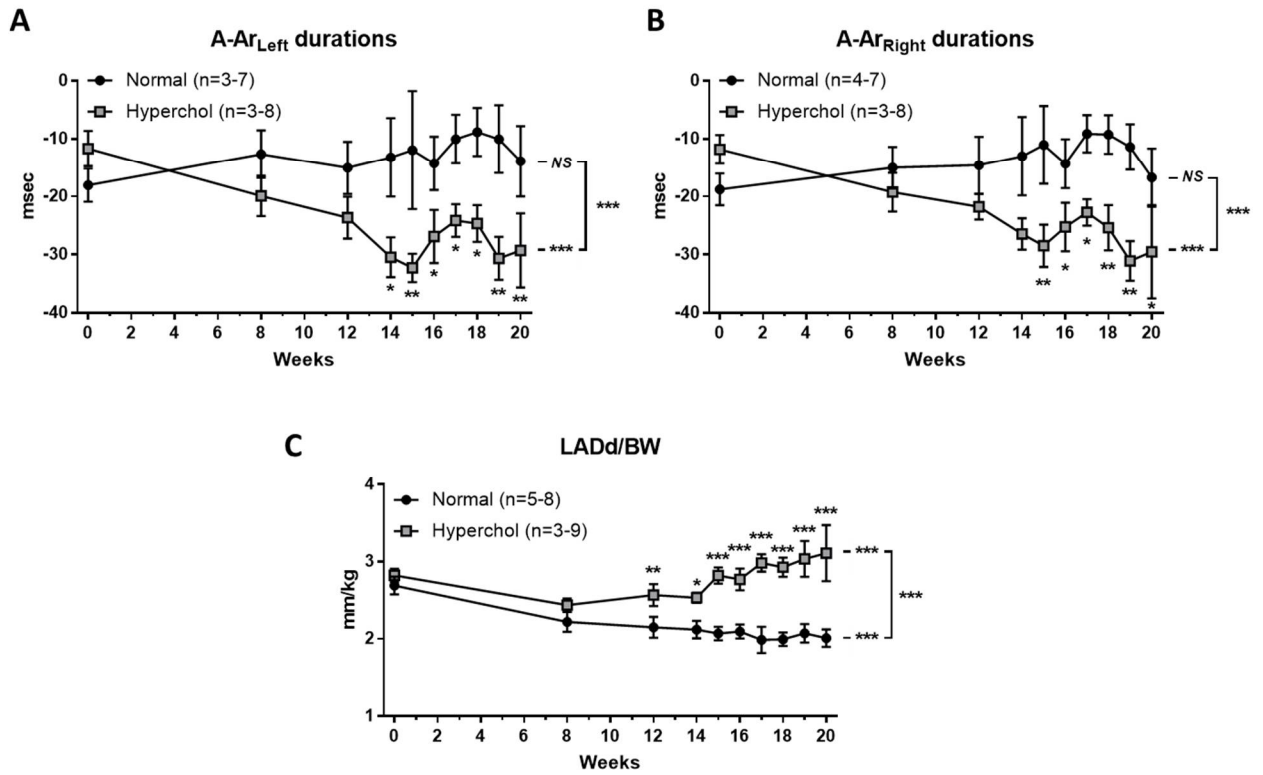


Figure 3

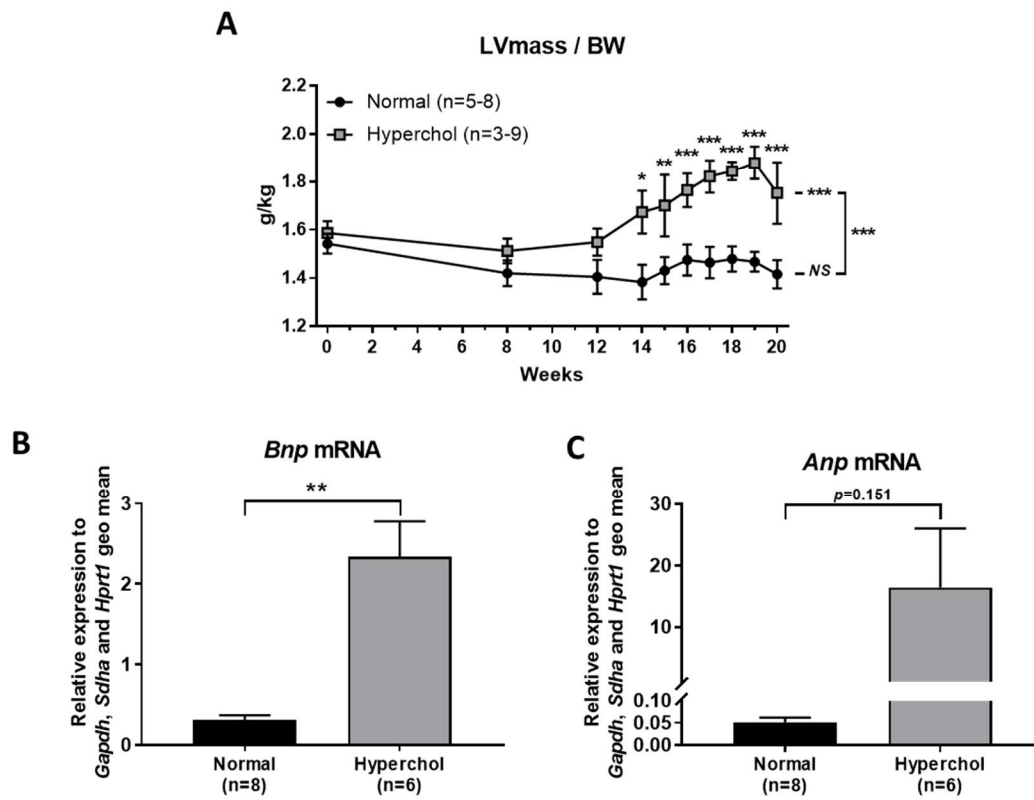


Figure 4

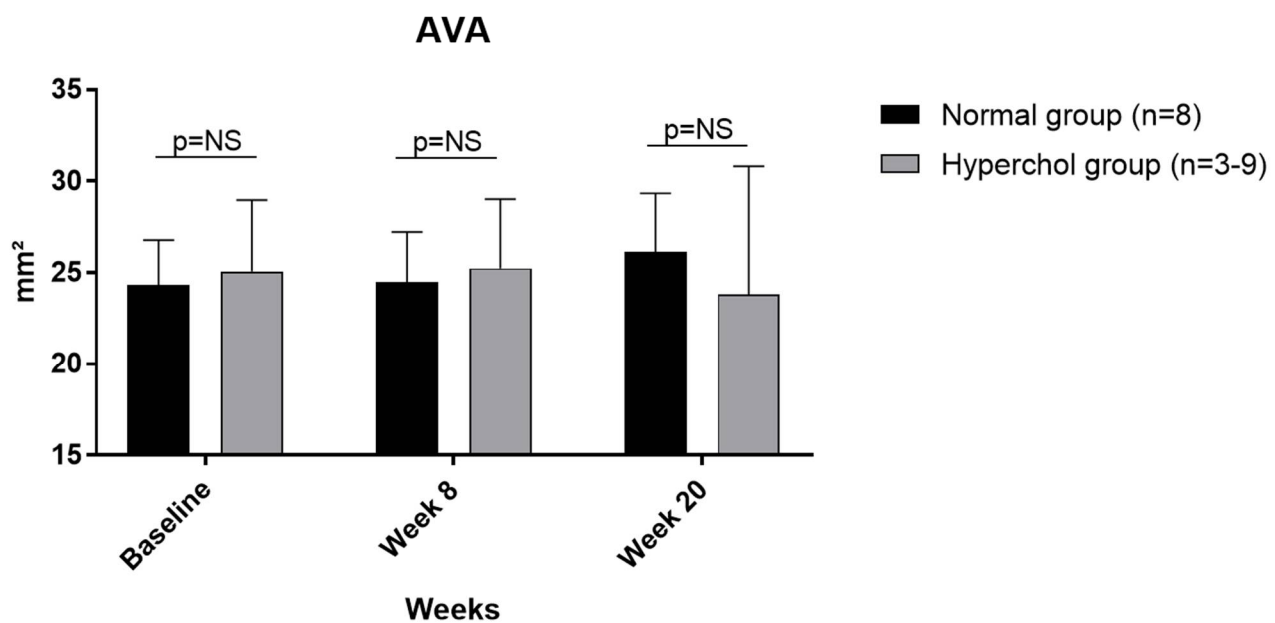


Figure 5

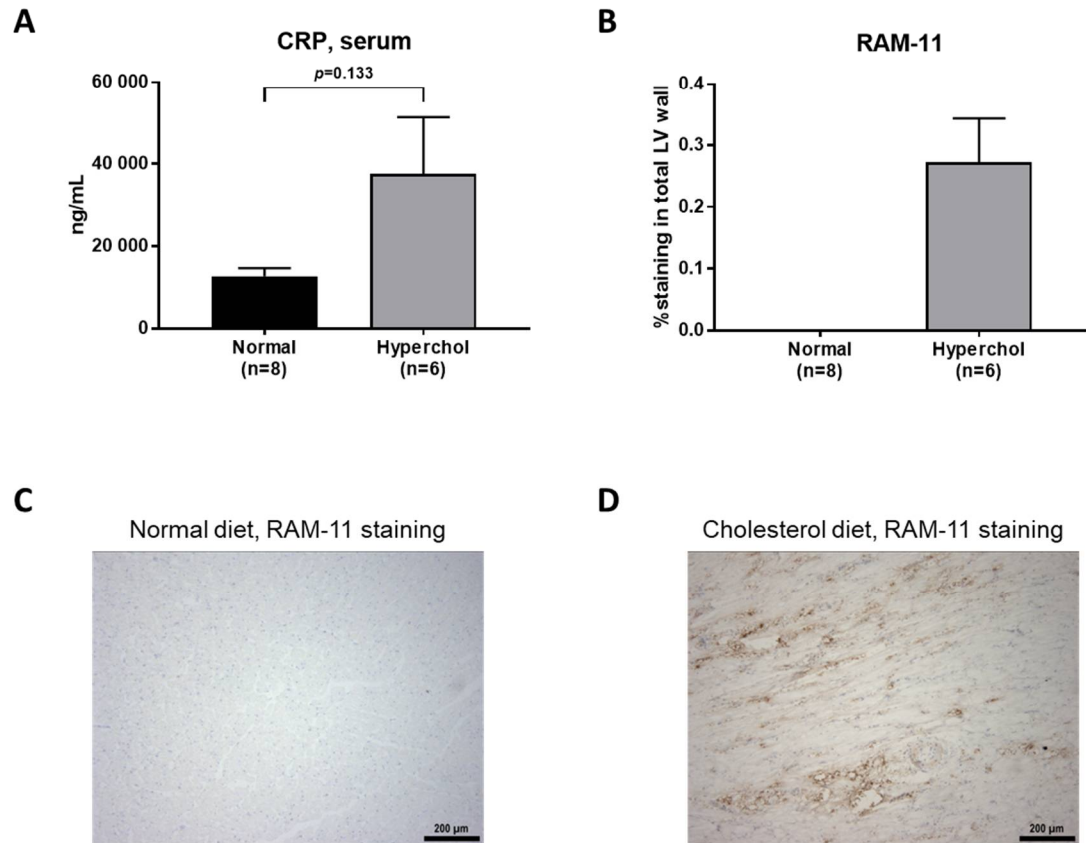


Figure 6

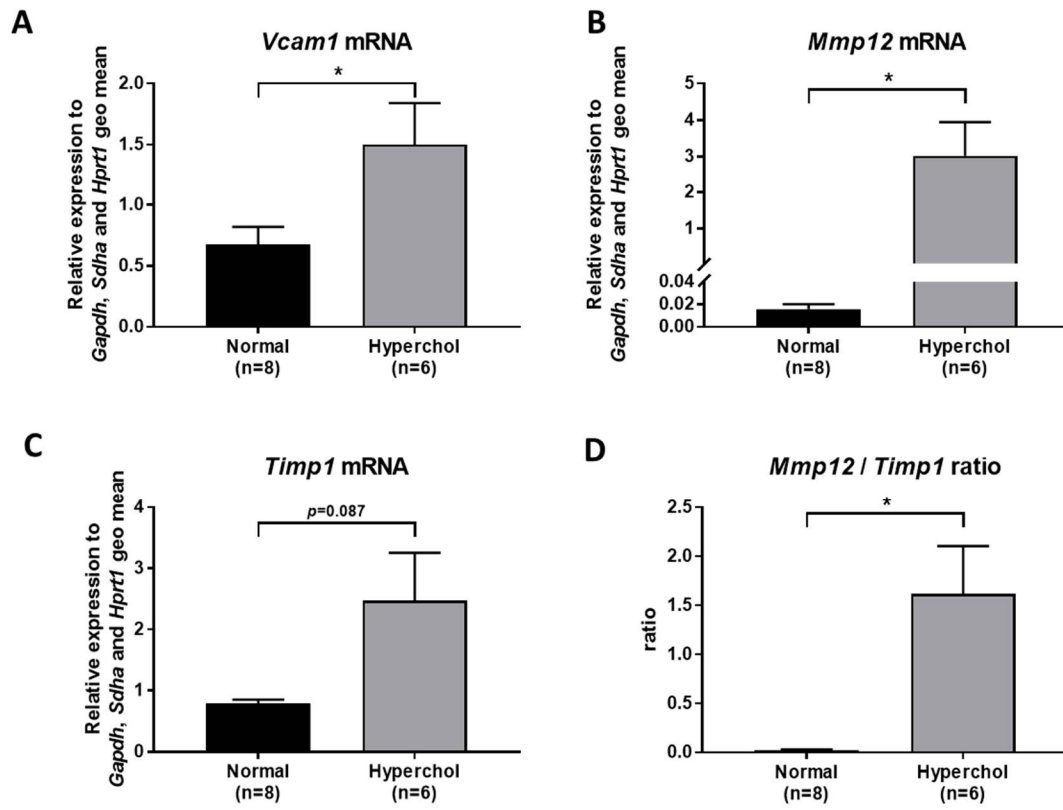


Figure 7

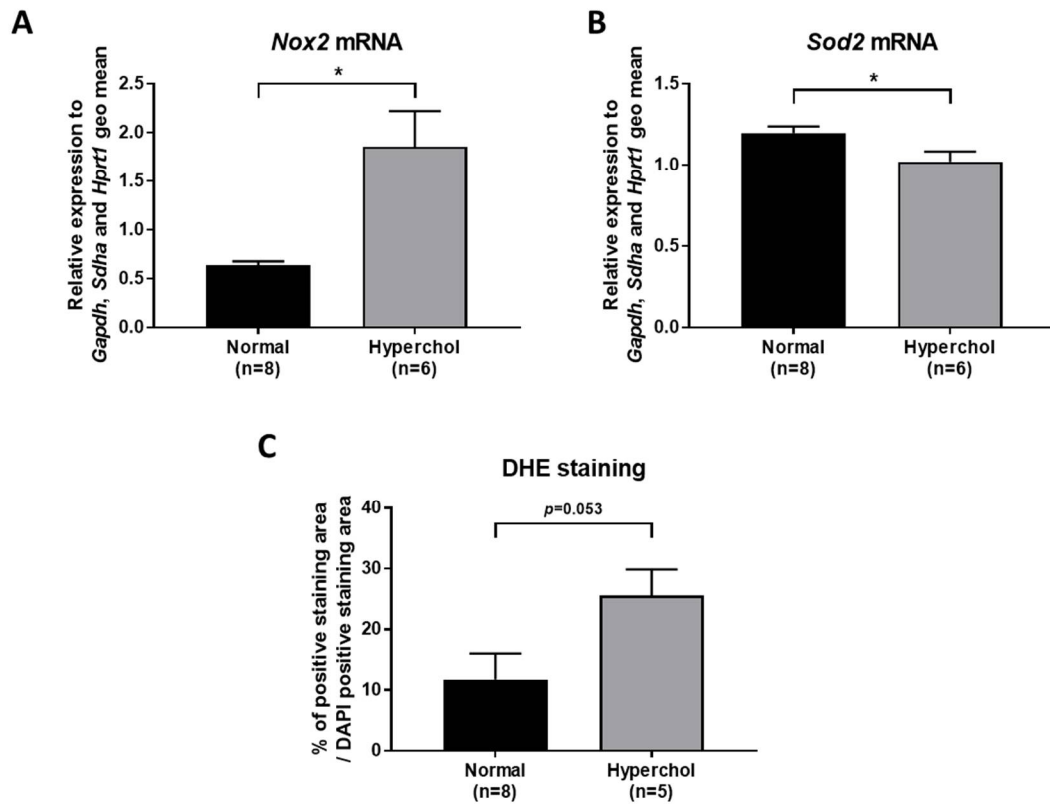
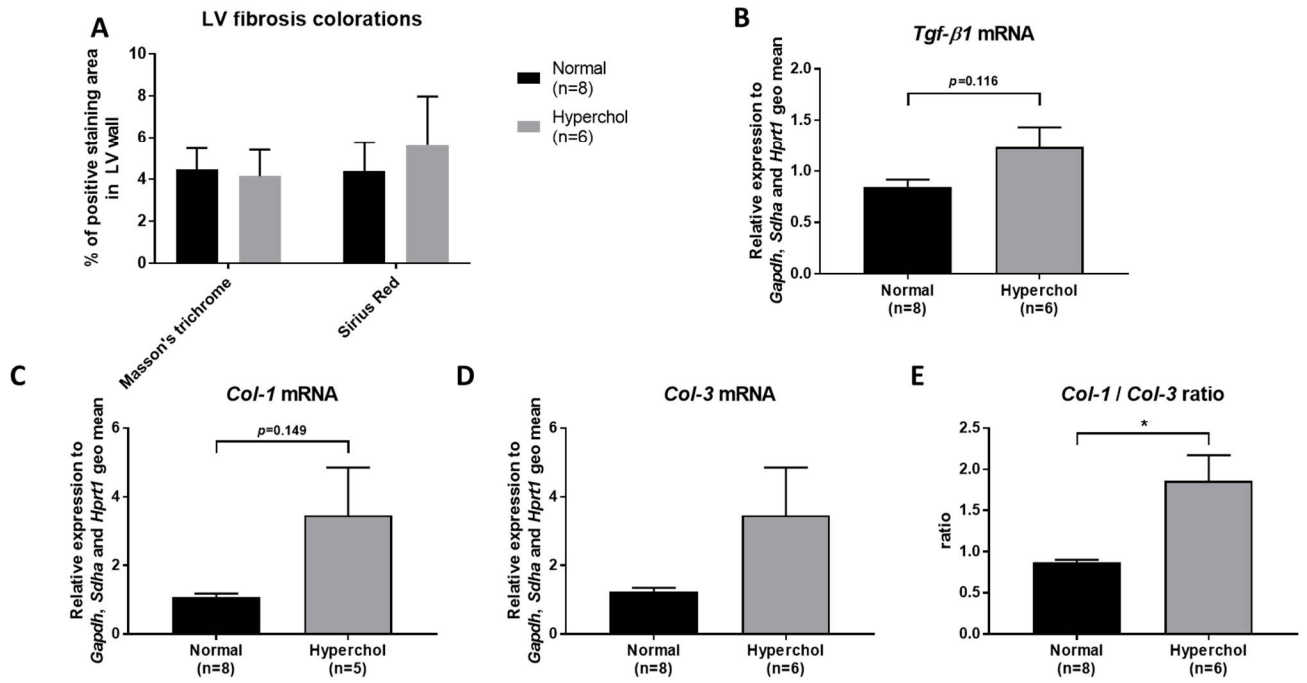


Figure 8

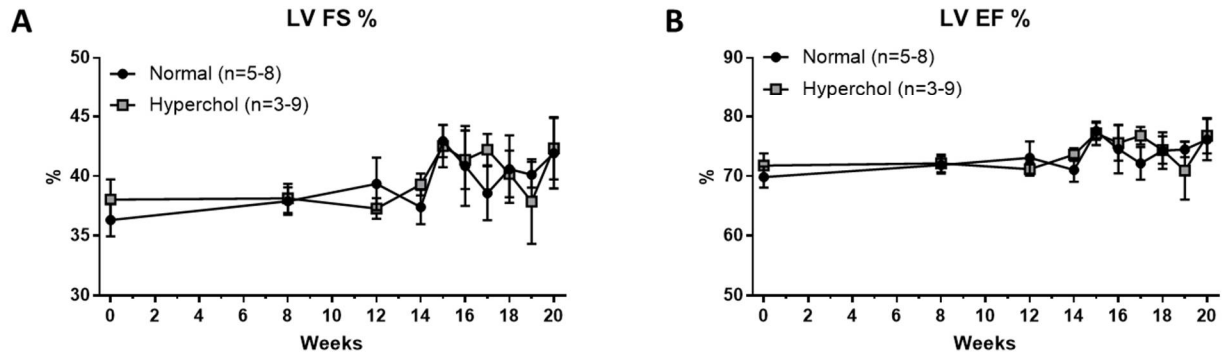


SUPPLEMENTARY DATA

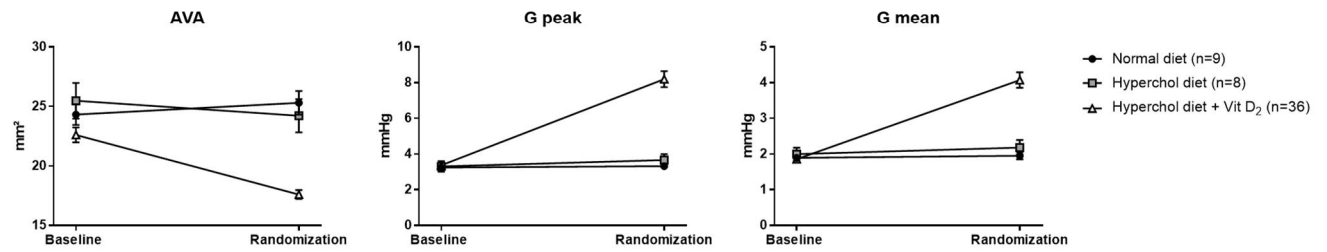
Supplementary Table S1: Forward and reverse primers of housekeeping genes and genes of interest

Gene Symbol	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Gapdh</i>	NM_001082253	TGGTGAAGGTCGGAGTGAAC	ATGTAGTGGAGGTCAATGAATGG
<i>Hprt1</i>	NM_001105671	CCTTGGTCAAGCAGTATAATC	GGGCATATCCTACAACAAAC
<i>Sdha</i>	XM_002723194	GGACCAGGACGCCATCCACTAC	TCCACCGAACGCACGCTGATAG
<i>Bnp</i>	XM_008275384	CCTGTGCCCTGGATGAG	CCGAAGCAGCCTGAGTCC
<i>Anp</i>	NM_001082262	GTACAACGCCATGTCCAAC	CTTCATCACTCTGCTCACTTAG
<i>Vcam1</i>	NM_001082152	GAACTTCTCGTGCTCTATTGTG	TGTGCTTCTACCAGACTGTATG
<i>Mmp12</i>	NM_001082771	GGCAACTGGACACATCTAC	GGCATACTCAACATCCTCAC
<i>Timp1</i>	NM_001082232	CTCATCGCTGGACAACTG	GCGTAGGTCTTGGTGAAG
<i>Nox2</i>	NM_001082100	AATGCTTGTGGCTGTGATAAG	TACCAGACTGACTTGAGGATG
<i>Sod2</i>	XM_008263745	CAAACCTGAGCCCTAACG	TGTTCCACACATCAATCC
<i>Tgf-β1</i>	XM_008249704	AGATAATGTCCTCCAAGTG	GAACTGTGTAGATGTTGAG
<i>Col 1</i>	XM_017348831	AGCCAGCAGATTGAGAAC	TCGCAGAAGACCTTGATG
<i>Col 3</i>	XM_002712333	CCTGAAGCCCCAGCAGAAAATTG	AGTTGGTCACTTGTACTGGTTGAC

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



Chapitre III: ApoA-I mimetic peptide does not improve left ventricular diastolic dysfunction in rabbits without aortic valve stenosis

Walid Nachar* M.Sc ^{a,b}, Nolwenn Merlet* Ph.D ^a, Foued Maafi M.Sc ^{a,b}, Yanfen Shi MD, PhD ^a, Téodora Mihalache-Avram M.Sc ^a, Mélanie Mecteau M.Sc ^a, Sonia Alem M.Sc ^a, Mathieu Brodeur Ph.D ^a, David Rhainds Ph.D ^a, David Busseuil Ph.D ^a, Eric Rhéaume Ph.D ^{a,b} and Jean-Claude Tardif MD ^{a,b}

^a Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, H1T 1C8, Canada

^b Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit boulevard, Montreal, H3T 1J4, Canada

* Authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

ABSTRACT

Background: We previously demonstrated that high-density lipoprotein (HDL) infusions may improve left ventricular diastolic dysfunction (LVDD) in an aortic valve stenosis (AVS) model. Whether the benefit was direct or mediated by the observed reduction in AVS severity is not clear. Here, we aimed to test the direct effect of an HDL mimetic on LVDD in the absence of AVS. **Methods:** Rabbits were exposed to three different protocols to develop LVDD without AVS. In the first model, rabbits were exposed to 0.5% cholesterol-rich diet for an average of 17 weeks without surgical intervention. In the second model, rabbits were subjected to surgical ascending aortic constriction (AAC) to mimic the effect of fixed reduced aortic valve area and studied after 10 weeks. The third model combined both cholesterol-enriched diet (for 12 weeks) and surgical AAC. The control group consisted of age-matched rabbits under normal diet. After development of LVDD, rabbits were randomized to receive infusions of saline or an apoA-I mimetic peptide (25 mg/kg) 3 times per week for 4 weeks. Detailed cardiac structure and function measurements were assessed at baseline, weeks 8, 12, 14, and 16 to 20, when applicable. Histological analyses and RT-qPCR were performed on LV samples. **Results:** In the three models, echocardiographic results showed development of LVDD over time, with preserved LV systolic and aortic valve functions when compared to the control group. Treatment with apoA-I mimetic infusions did not significantly improve echocardiographic parameters nor molecular markers of cardiac inflammation, oxidative stress and fibrosis. **Conclusion:** ApoA-I mimetic peptide therapy did not directly improve LVDD. These results indicate that previously observed changes of LVDD were caused by AVS improvement induced by this treatment.

1. INTRODUCTION

Left ventricular diastolic dysfunction (LVDD) is a complex disease which affects ventricular relaxation and compliance [1]. Numerous underlying diseases have been reported to cause LVDD, including left ventricular (LV) hypertrophy, cardiac ischemia and aortic valve stenosis (AVS) [2]. Mechanisms altered in LVDD are still not well known, but cardiac fibrosis, inflammation and oxidative stress are frequently mentioned [3-6]. Yet, no effective treatment is available and patients with LVDD are treated for the associated diseases rather than the pathology itself [7].

High-density lipoprotein (HDL) and its mimetic peptides have demonstrated pleiotropic effects, generally reducing endothelial dysfunction [8], inflammation [9] and fibrosis [10]. Circulating levels of HDL-cholesterol have been inversely correlated to LVDD in the general population [11-13]. Conversely, high HDL-cholesterol levels caused by overexpression of the apoA-I gene *via* adenoviral vector use, demonstrated beneficial effects on cardiac remodeling and diastolic function in infarcted mice [14,15]. In a previous study, we reported that the HDL mimetic CER-522 improved LVDD in a rabbit model of AVS [16]. However, beneficial effects of treatment were simultaneously found on both LVDD and AVS parameters. Whether HDL mimetics might have direct effects on LVDD, or the beneficial effects on LVDD were due to AVS improvement, or both, could not be addressed in that study. In the present investigation, we developed different rabbit models of LVDD, without the presence of valvular stenosis, and aimed to test the direct effects of an HDL mimetic on LVDD.

2. METHODS

Experimental design

Animal care and procedures complied with the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Montreal Heart Institute Research Center ethics committee for animal research.

Three (3) rabbit LVDD models using a cholesterol-enriched diet and/or a surgical procedure were developed (supplementary figure S1). A first model consisted in rabbits fed with a 0.5% cholesterol-enriched diet (Teklad Global Rabbit Diet 2030, *Harlan Laboratories*, Madison, WI, USA) until the lateral mitral echocardiographic parameter E/Em ratio value exceeded mean + 2 standard deviation (SD) compared to baseline (high cholesterol diet (HCD) group, n=13); the average duration of the diet period was 17 weeks. The second model consisted in surgery-induced LV pressure overload through partial ascending aorta constriction (AAC group, n=15; 1 rabbit died during surgical procedure); those rabbits were fed a normal diet and followed for 10 weeks after the surgical procedure. The third model involved the AAC procedure performed 2 weeks after initiation of the 0.5% cholesterol-enriched diet (HCD-AAC group, n=27; 1 rabbit died during surgical procedure); total duration of the diet was 12 weeks. Control rabbits were fed a normal diet and matched for diet duration (control group, n=13).

After LVDD development, rabbits were randomized to receive either placebo (saline groups) or an apoA-I mimetic peptide (25 mg/kg (see description below), i.v. [marginal ear vein], 3 times a week for 4 weeks; ApoA-I groups). During the 4-week treatment period, the cholesterol content in the diet was reduced to a 0.2% to lower risks of hepatic dysfunction associated with fat accumulation. Two (2) HCD-AAC rabbits died

during the first week of the treatment period (1 rabbit receiving saline and 1 rabbit receiving apoA-I mimetic peptide). Rabbits were sacrificed 1 day after the last infusion by exsanguination under anaesthesia after cardiac arrest in diastole (2% lidocaine, 5-10 mL, i.v.). Then, the LVs were removed, flushed with sterile saline, and stored for histological analyses (immersion-fixed in 10% buffered formalin at 4 °C for 24 h and embedded in paraffin) and molecular studies (tissue was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C).

Surgical procedure

Partial AAC procedure was performed 2 weeks after the beginning of the protocol. Rabbits received pre-operative analgesia with buprenorphine (30 µg/kg, s.c., *Schering-Plough*, Hertfordshire, UK) and were placed in anesthesia chamber for induction (isoflurane [*Abbot*, Montreal, QC, Canada], 2.5-4%, 1 L/min oxygen, adapted to heart rate and breathing rate). After adequate anesthetic depth was achieved, rabbits were intubated (v-gel® for rabbits, size R3, *Docsinnovent*, London, UK) and inhalant anesthesia with isoflurane (2-4%, 1 L/min oxygen) was maintained under spontaneous respiration. Rabbits were then placed in a supine position on a warming pad to control thermoregulation. Following shaving and sterile prep and drape of the chest, a median sternotomy was performed with the help of disposable fine tip cautery (AA01, *Bovie, Dufort et Lavigne*, Montreal, QC, Canada). After a midline skin and muscle incision was made over the sternum, the xiphoid process was carefully detached from the sternal part of the diaphragm. To avoid injury to the parietal pleura, the median incision went straight up the xiphoid process toward the jugular notch at the superior border of the manubrium of the sternum

exactly along the midline of the sternum. The chest was maintained opened using curved forceps. The two lobes of the thymus were separated carefully to expose the ventral side of the aorta in the most anterior aspect of the pericardial sac. A median incision was made at the pericardial sac to expose the ascending aorta. A microclip applicator (Weck Horizon #437117, *Teleflex*, Markham, ON, Canada), modified as previously described [17], was calibrated to allow a 50% reduction of the ascending aorta diameter (previously measured by echocardiography at week 1). The sterile titanium clip (Hemoclips Large Horizon #004200, *Teleflex*) was loaded into the applicator and placed across the ascending aorta, 10 to 12 mm above the aortic valve. The two sternal halves were approximated, and the sternum was drained and closed (coated suture Vicryl PLUS 3-0, #VCP442H, *Ethicon, Johnson & Johnson*, Montreal, QC, Canada). Muscle layers and skin were subsequently closed with Vicryl 3-0 and silk 3-0 sutures, respectively. Perioperative care consisted in ketamine (25 mg/kg, i.m.), buprenorphine (20 µg/kg, s.c.) and fluid (Ringer Lactate, 50 mL, s.c.) administrations. Post-operative infection management consisted in a prophylactic dose of Borgal (67 mg/kg, s.c.) after the surgery combined to a sterile dressing applied on the surgical wound, with daily surveillance of the surgical sutures. Post-operative analgesia was managed by administrations of buprenorphine (50 µg/kg, s.c., twice a day, 2 doses or more when needed) and ketoprofen (5 mg/kg, s.c., once a day, for 5 days). Non-absorbable sutures were removed two weeks after surgery.

ApoA-I mimetic peptide

The apoA-I mimetic peptide (H-Pro-Val-Leu-Asp-Leu-PheArg-Glu-Leu-Leu-Asn-Glu-Leu-Leu-Glu-Ala-Leu-Lys-Gln-LysLeu-Lys-OH) was complexed with egg sphingomyelin

and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [18] in a 1:1:1 weight ratio by mixing the components in saline and performing multiple heating and cooling cycles until the solution appeared perfectly clear. The final complex aims to mimic ETC-642 [19]. Fresh solution was reconstituted every week under sterile conditions and kept at 4°C.

FC esterification and cholesterol efflux tests

To assess the functionality of ETC-642-like complexes, plasma free cholesterol (FC) esterification in HDL particles and cellular cholesterol efflux capacity of the apoA-I mimetic complexes were assessed. FC esterification was conducted in triplicate samples of pooled human normolipidemic plasma obtained from healthy volunteers (*BioIVT*, Westbury, NY, USA). Just before the esterification assay, apoB-containing lipoproteins (VLDL and LDL) were depleted by precipitation with 0.4 volume of PEG 6000 20% (p/v) in 0.2 M glycine pH 7.4 for 20 min on ice and centrifugation at 10,000 g for 30 minutes at 4°C. HDL-enriched plasma samples were spiked with increasing concentrations of apoA-I mimetic complexes (0-250 µg/ml) and incubated or not for 2h at 37°C. FC in HDL-enriched samples was determined by the Wako Free Cholesterol assay kit as described by the manufacturer. The mass of FC esterified (in µg) was calculated as the difference between FC in time zero samples and FC after 2h incubation, which corresponds to esterification by endogenous lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT).

For cholesterol efflux assays, J774 mouse macrophages were seeded on the first day in 48-well plates (*Corning*). On the third day, when cells reached 80% confluence, they were cholesterol-loaded with acetylated LDL (50 µg protein/ml) and labeled with ³H-cholesterol (2 µCi/ml, *Perkin-Elmer*) in DMEM containing 1% fetal bovine serum for 24h.

The medium was changed for DMEM plus 0.2% bovine serum albumin (BSA) for 20h to allow equilibration of cholesterol into cellular compartments, in presence or not of 300 μ M cyclic AMP (cAMP) to induce the expression of the ABCA1 cholesterol transporter. During the 4h efflux phase, equilibration medium was replaced with phenol red-free DMEM containing increasing concentrations of ETC-642-like complexes (0-100 μ g/ml). Efflux medium was collected, floating cells were pelleted by low-speed centrifugation, and aliquots of cell-free media and cell homogenates (in 0.1 N NaOH) were counted on a beta-counter (Tricarb, *Perkin-Elmer*). Percent radioactive cholesterol efflux was calculated as medium counts (cpm) divided by total counts in each well (cells plus medium) times 100%. Parameters of efflux curves (maximal efflux and efflux constant) were calculated by non-linear regression in Prism software (*GraphPad*) using a one-component model.

Echocardiography

Examinations were carried out with a phased-array probe 10S (4.5 ~ 11.5 megahertz) using a Vivid 7 Dimension system (*GE Healthcare Ultrasound*, Horten, Norway). Intra-muscular injections of ketamine (35 mg/kg) and midazolam (0.9 mg/kg) were used for sedation. Echocardiographic examinations were performed during the LVDD development period (at baseline, weeks 8, 12 and every week from week 14 when applicable), and then weekly during the treatment period to assess several parameters of LV systolic and diastolic functions and aortic valve function, as previously described [16]. For AAC-rabbits, successful constriction of the ascending aorta was validated during LVDD development period (at baseline, weeks 1, 3, 8 and 12) by monitoring ascending aortic flow using echocardiography. Continuous wave Doppler interrogation across the constricted site was

used to obtain peak aortic flow velocity (V_{peak}), peak and mean cross constriction gradient pressure (G_{peak} and G_{mean} , respectively). The mean of results obtained at week 0 and week 1 was considered as the baseline value. Constriction leading to an increase $>100\%$ of G_{peak} compared to baseline during all the development period was considered successful; rabbits that did not meet this criterion (3/14 rabbits under normal diet, and 5/26 rabbits under hypercholesterolemic diet) were excluded.

RNA extraction and cDNA synthesis

LV tissue (200 to 400 mg) was homogenized in Trizol buffer using “PowerGen 125” homogenizer (*Fisher Scientific*, ON, Canada) for approximately 60 seconds. Homogenates were then aliquoted into 5 tubes and one of the aliquote was used to extract total RNA using Qiagen miRNeasy Kit (*Qiagen*, ON, Canada). The quality and quantity of total RNA was assessed using Agilent RNA 6000 Nano Kit for Bioanalyzer 2100 System (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). RNA integrity numbers (RIN) were higher than 8/10 for all samples. One (1) μg of total RNA was used to generate first strand of complementary DNA (cDNA) using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (*Applied Biosystems*, CA, USA) in a final reaction volume of 20 μl according to manufacturer’s instructions.

mRNA quantification using real-time PCR

Quantitative RT-PCR experiments were performed using Bio-Rad CFX384 thermal cycler. Final reaction volume was 10 μl and composed of 1X SyberGreen (GoTaq® qPCR Master Mix, *Promega Corporation*, Madison, WI, USA or Perfecta SyberGreen FastMix®, ROX

TM, Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA), 0.4 μ M of forward and reverse primer, and 2.16 ng of cDNA template. Initial denaturation was made at 95°C for 5 min. Amplification was then performed during 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 sec and annealing/extension at 60 °C for 1 min. At the end, a dissociation curve was produced to analyze and confirm the specificity of the amplification by observation of a single peak in the curve. Standard curves of five to seven points were produced for each gene to transform sample's Cts to relative expression values. Amplification efficiencies were calculated according to Pfaffl's method [20]. All samples were run in duplicate and the mean values were used for calculations. Relative quantities of mRNA transcripts for *Vcam1* (vascular cell adhesion molecule 1), *Mmp12* (matrix metalloproteinase 12), *Timp1* (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), *Sod2* (superoxide dismutase 2), *Nox2* (NADPH oxidase 2), *Col1* (type 1 collagen) and *Col3* (type 3 collagen) were normalized against the normalization factor (NF) which was calculated from the geometric means of the expression of the best three reference genes *Gapdh* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *Sdha* (succinate dehydrogenase complex, subunit A) and *Hprt1* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) as selected by geNorm. Primers sequences are presented in supplementary data (Table S1).

Histology and immunohistochemistry staining

Ventricles were harvested following sacrifice and processed as previously described [21]. Macrophage content was assessed by quantification of RAM-11 staining on ventricular transverse sections (8 μ m) as previously described. All pictures were taken using a computer-based digitizing image system using a light microscope (*Olympus* BX41,

Richmond Hill, ON, Canada) connected to a digital video camera Q-Color3 (*Olympus*) using Image Pro Plus version 8.0 (*Media Cybernetics*, Bethesda, MD, USA) for picture acquisition and analysis.

Dihydroethidium (DHE) staining

Superoxide production, a marker of oxidative status, was assessed by staining fresh tissue sections with dihydroethidium (DHE) as previously described [6], and with DAPI (*Sigma-Aldrich*, #D9542) as counterstaining. Dihydroethidium is oxidized in the presence of superoxide and form fluorescent ethidium, which was detected by fluorescence with a Zeiss LSM-710 inverted confocal laser scanning microscope equipped with 410/502 nm excitation/emission filters. As negative control, sections were incubated with 300 U/mL of superoxide dismutase (SOD, *Sigma-Aldrich* # S5395) before staining with DHE; fluorescent signal was abolished in comparison with other samples. A 20X magnification with a 0.8 zoom-out was used for picture acquisition. The analysis was performed with Image Pro Plus version 8.0 (*Media Cybernetics*) on 4 pictures/ LV section. Fluorescence was quantified by counting the signal pixels in correspondent image fields then normalizing to DAPI staining.

Statistical methods

For the Doppler-echocardiography parameters during LVDD development period, the changes between the last value before treatment and baseline value were computed.

Two-way ANOVA models with surgery (control or AAC), diet (no diet or high cholesterol diet) and surgery x diet interaction (leading to 4 groups: control, HCD, AAC

or HCD-AAC) as independent variables were performed on these changes. Under the ANOVA model, the mean change of the HCD, AAC and HCD-AAC groups respectively were compared to the mean change of the control group. In addition, using the same ANOVA model, the mean changes within each group were formally tested against zero.

For the treatment period, the three LVDD groups (HCD, AAC and HCD-AAC) were randomized respectively to receive either ApoA-I or saline in a 1:1 ratio. The Doppler-echocardiography parameters at different follow-up time points (w1, w2, w3 and end of study) were analyzed using a repeated measures ANCOVA models including terms for LVDD group, treatment, time and all their interactions as well as covariates for response variable at start of treatment-by-LVDD group interaction and response variable at start of treatment-by-LVDD group-by-time-interaction. An unstructured covariance structure was used to model the within-subject errors and the Kenward-Roger approximation was used to estimate denominator degrees of freedom. Under the ANCOVA model, the comparisons between the adjusted mean in ApoA-I and the adjusted mean in Saline at the last follow-up time point within each of the three LVDD groups were performed.

Molecular and histological results were compared between ApoA-I vs. Saline within each of the three LVDD groups using two-way ANOVA model with LVDD group, treatment and their interaction.

Statistical analyses were performed using SAS statistical software version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and conducted at the 0.05 significance level.

3. RESULTS

Rabbits submitted to a hypercholesterolemic diet alone, aortic constriction alone, or the combination developed LVDD

Progression of LV diastolic function parameters was evaluated by Doppler-echocardiography as the change (Δ) between the last value in the LVDD-development period and baseline value. The mitral peak E-wave velocity remained stable in control ($p=0.325$) and AAC rabbits ($p=0.359$; Figure 1A), while it significantly increased over time in both HCD and HCD-AAC rabbits ($p=0.004$ and $p=0.003$ versus baseline; $p=0.002$ and $p=0.003$ versus controls, respectively). The mitral E/A ratio did not change significantly over time in control ($p=0.217$), HCD ($p=0.352$) and AAC animals ($p=0.109$), but increased in HCD-AAC rabbits ($p=0.049$ versus baseline; $p=0.020$ versus controls, Figure 1B). From tissue Doppler imaging of the lateral mitral annulus, we assessed Em-wave peak velocity to calculate the E/Em ratio (Figure 2A). While the E/Em ratio remained stable in controls ($p=0.502$), it significantly increased in HCD ($p<0.001$ versus baseline and versus controls), AAC ($p=0.004$; $p=0.077$ versus controls) and HCD-AAC rabbits ($p=0.010$; $p=0.244$ versus controls). The difference between the durations of mitral A-wave and atrial reversal wave (Ar) in the left pulmonary vein ($A-Ar_{Left}$) was stable over time in controls ($p=0.219$) but became markedly more negative (greater diastolic dysfunction) in the 3 experimental groups (HCD: $p<0.001$; AAC: $p=0.008$; HCD-AAC: $p<0.001$; $p=0.001$, $p=0.006$ and $p<0.001$ versus controls, respectively, Figure 2B). Left atrial dimension during diastole indexed to body weight significantly decreased over time in the control group ($p<0.001$),

while it remained constant in the three experimental groups (HCD: $p=0.345$; AAC: $p=0.722$; HCD-AAC: $p=0.111$), resulting in significant differences when compared with controls ($p=0.038$, $p=0.019$ and $p<0.001$, respectively; Figure 2C). Taken together, these results are consistent with LVDD progression and increased LV filling pressures in the experimental models.

Rabbits in the LVDD groups developed LV hypertrophy but not LV systolic or reversible aortic valve dysfunction

LV mass determined by echocardiography and indexed to body weight remained stable in control rabbits ($p=0.255$), but increased over time in HCD, AAC and HCD-AAC rabbits ($p=0.023$, 0.096 and <0.001 respectively; $p=0.018$, 0.043 and <0.001 versus controls; Figure 3A). LV ejection fraction either remained stable or increased over time in all groups (controls: $4.6\pm1.8\%$, $p=0.023$; HCD: $5.0\pm1.3\%$, $p=0.002$; AAC: $-0.05\pm0.80\%$, $p=0.953$; HCD-AAC: $2.8\pm1.3\%$, $p=0.038$; Figure 3B). The mean pressure gradient across the aortic valve remained stable over time and similar between control and HCD rabbits ($p=0.655$, Figure 3C).

Effects of the apoA-I mimetic peptide on free cholesterol esterification in human plasma and cholesterol efflux capacity from AcLDL-loaded J774 cells.

Biological activity of the apoA-I mimetic peptide complex was first tested *in vitro* on both human plasma and murine J774 macrophages. Free cholesterol (FC) esterification was increased after the addition of the apoA-I mimetic complexes on apoB-depleted plasma for 2 hours at 37 °C (Figure 4A). This increase was dose-dependent, and the maximal effect

was seen at the dose of 125 µg/mL of apoA-I mimetic peptide (86%). Figure 4B shows the capacity of our apoA-I mimetic complexes to increase cholesterol efflux from murine macrophages J774 in absence or presence of cAMP stimulation, the latter to induce ABCA1-dependent cholesterol efflux (Figure 4B).

A four-week treatment period with the apoA-I mimetic peptide did not improve LV diastolic function in rabbits from the LVDD groups.

We did not find significant effects of apoA-I mimetic treatment compared to saline infusions on echocardiographic parameters of LVDD, in any of the 3 model groups (Figure 5A). The evolution of the mitral E/A ratio was not significantly different in apoA-I vs. saline-treated rabbits for all 3 experimental protocols (HCD rabbits, $p=0.322$; AAC-rabbits, $p=0.257$; HCD-AAC rabbits, $p=0.581$; Figure 5B). There was no significant difference between apoA-I and saline-treated animals for lateral E/Em ratio (HCD: $p=0.933$; AAC: $p=0.222$, and HCD-AAC: $p=0.379$, respectively; Figure 5C) or A-Ar_{Left} duration differences (HCD: $p=0.132$; HCD-AAC: $p=0.204$; AAC: p value not calculated because of missing values; Figure 5D).

Treatment with the apoA-I mimetic peptide did not improve cardiac markers of inflammation, oxidative stress and fibrosis ex vivo.

Several pathophysiological mechanisms have been proposed to contribute to diastolic dysfunction, such as cardiac inflammation, oxidative stress or fibrosis. We therefore explored molecular markers known to be involved in these pathways (Figures 6 to 8).

We identified cardiac macrophages using RAM-11 immunostaining on histological LV sections (Figure 6A). No staining could be detected in control nor AAC rabbits whereas macrophage infiltration was observed in HCD rabbits ($0.27 \pm 0.06\%$ of LV area) and HCD-AAC rabbits ($0.16 \pm 0.05\%$). ApoA-I mimetic peptide treatment had no significant effect on macrophage infiltration in these two LVDD-rabbit models ($p=0.419$). The increased cardiac mRNA expression of *Vcam1* quantified by qPCR analysis in LVDD rabbits was not modified by apoA-I treatment compared to saline ($p=0.736$; Figure 6B). Cardiac expression of *Mmp12* was undetectable in control rabbits, mild in AAC rabbits and more intense in HCD and HCD-AAC rabbits; apoA-I mimetic peptide treatment had not significant effect on *Mmp12* levels in the three LVDD-rabbit models ($p=0.396$; Figure 6C). Cardiac *Timp1* expression was increased in HCD rabbits only, and apoA-I treatment did not significantly reduce its expression in the latter ($p=0.4783$; Figure 6D). The increased *Mmp12/Timp1* ratio observed in HCD and HCD-AAC rabbits was not significantly altered by apoA-I treatment ($p=0.472$; Figure 6E).

Cardiac expression of *Sod2* mRNA was decreased and that of *Nox2* mRNA increased in LVDD rabbits compared to controls (Figures 7A and B, respectively). Treatment with apoA-I mimetic peptide had no significant effect on these oxidative stress markers ($p=0.353$ and $p=0.104$, respectively). Also, increased DHE staining in LVDD rabbits was not modified by apoA-I mimetic treatment ($p=0.570$; Figure 7C).

Cardiac fibrosis was explored at the molecular level with the quantification of *Col1* and *Col3* mRNA expression (Figures 8A-C). *Col1* level was increased in HCD rabbits only and not significantly modified by apoA-I treatment ($p=0.105$; Figure 8A). Compared to controls, *Col3* mRNA expression was unchanged in HCD rabbits, increased in AAC rabbits

and decreased in HCD-AAC rabbits; no effect of apoA-I treatment was observed ($p=0.218$; Figure 8B). The *Col1/Col3* ratio was increased in HCD rabbits only, but this was not altered by apoA-I infusions ($p=0.241$; Figure 8C).

4. DISCUSSION

Diastolic dysfunction is a complex disease that remains poorly understood and for which there are no specific treatments. Indeed, patients suffering from LVDD are only treated for associated conditions such as hypertension or myocardial ischemia. We previously reported improvement of LVDD with apoA-I mimetic peptide infusions in an AVS rabbit model [19]. However, we could not evaluate whether those beneficial effects on cardiac function were direct or mediated by AVS improvement. In the present study, we used three rabbit models of LVDD without presence of AVS to test the possible direct effect of an apoA-I mimetic peptide on LVDD. Using echocardiography and cardiac molecular analysis we demonstrated the lack of benefits of this treatment on LVDD.

The complexity of LVDD is partly due to the fact that there are many etiological factors at play. There are therefore different approaches to induce LVDD, likely with different underlying mechanisms, which led us to use three such rabbit models. The first one is a lipid-mediated LVDD model, where rabbits were exposed to a high cholesterol diet (without vitamin D₂). Previous reports suggested that 12 weeks of a high cholesterol diet would induce LVDD [22]. In contrast, serial echocardiographic examinations in our study showed that LVDD was detectable after an average period of 17 weeks with the high cholesterol diet. The E/Em ratio is one of the best echocardiographic parameters that

correlates with hemodynamic status in LVDD [23-25]. Our cut-off value for LVDD was a value higher than baseline mean+2SD.

The second model involved a surgical procedure, where constriction of the ascending aorta creates increased LV afterload [26,27]. The third model was a combination of the first two models, with surgical constriction of the ascending aorta while rabbits also receive a high-cholesterol diet. All three models resulted in increased LV filling pressures according to echocardiography (increased E/Em ratio and more negative A-Ar duration differences). Based on mitral inflow patterns, LVDD grade was different between those models, with grade I (impaired relaxation) for AAC rabbits (decreased E/A ratio), grade II (pseudonormal mitral inflow) for HCD rabbits (pseudonormal E/A ratio), and grade III (restrictive pattern) for the combined model HCD-AAC (increased E/A ratio). Rabbits from all three models presented LV hypertrophy and normal systolic function. Moreover, HCD rabbits were confirmed to have normal aortic valve function. We could not evaluate aortic valve function in surgical rabbits, due to the presence of the surgical clip placed on the ascending aorta, but we can at least assume that aortic valve function should be normal under normal diet (AAC rabbits). The same should apply to HCD-AAC rabbits as in HCD animals (*ie* unaltered aortic valve). Altogether, these data show that our rabbit models developed LVDD and LV hypertrophy, without LV systolic or aortic valve dysfunction.

At the molecular level, there was evidence of cardiac inflammation (RAM-11 macrophage infiltration), cardiac oxidative stress (increased DHE staining) and extra-cellular matrix remodeling (*Mmp12* expression) in rabbits fed a high cholesterol diet (HCD and HCD-AAC groups). These alterations were not observed in AAC animals under normal diet. These data suggest that LVDD in AAC rabbits might be due to increased

afterload and LV hypertrophy, whereas the observed cardiac molecular alterations are mostly due to hypercholesterolemia and might contribute to diastolic dysfunction.

Once LVDD was established, rabbits were treated with an apoA-I mimetic peptide complex or saline infusions for four weeks. We previously showed that this mimetic complex was beneficial for experimental AVS in rabbit and mice models [19,28]. In contrast, the apoA-I mimetic peptide had no detectable direct effect on LVDD in the current study. This suggests that improvement of LVDD seen in our previous study with another apoA-I mimetic peptide was mostly mediated by AVS improvement but not due to a direct effect on diastolic function.

Our *in vitro* results showing that the apoA-I mimetic peptide complex used in the current study was able to increase cholesterol esterification and fractional esterification rate when added to depleted plasma, confirm the biological activity of our reconstituted complex. A few hypotheses can be considered to explain the neutral effects of our mimetic peptide on LVDD *in vivo*. First, the apoA-I mimetic peptide might have been retained by LDL and VLDL given the very high levels of these lipoproteins in our animals fed with a high cholesterol diet. However, this potential issue did not prevent the apoA-I mimetic to affect favourably AVS in our previous studies [19,28]. Furthermore, results in rabbits having undergone aortic constriction and receiving a normal diet show that the neutral effect of treatment is not only due to this retention hypothesis. Second, the role of the administration route and lipidation of apoA-I peptides should be considered. Indeed, lipid-free apoA-I peptide has a shorter half-life than phospholipid complexes [29]. In rats, intraperitoneal injections are more often used possibly because of the challenge of repeated injections in the tail vein. In rats with metabolic syndrome, such injections of reconstituted

HDL improved LVDD (improved E/A ratio) after 7 days of treatment, but not later [30]. However, intravenous injections of apoA-I particles may reach the vasculature more efficiently, and thus this point should not have been problematic. Third, the choice of the dose to administer could also be questioned. The dose of 25 mg/kg of apoA-I mimetic peptide utilized in the current study was previously used in other studies [16,19] and demonstrated to be effective to reduce AVS in rabbits. Finally, selecting the right timing to start treatment may also be of importance. Here, our strategy was to bring animals to a significant level of LVDD before giving any treatment. Rabbits may have reached an irreversible stage of this disease, and treatment administration might have been too late to improve LVDD. However, in our previous study where apoA-I mimetic peptide treatment improved both AVS and diastolic function, LVDD presented a restrictive filling pattern that was at least the same grade or even more severe than the LVDD developed in the three present models.

5. CONCLUSION

ApoA-I mimetic peptide therapy did not directly improve LVDD. These results indicate that previously observed changes of LVDD were caused by AVS improvement induced by this treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Craig Selzman, MD, and Amanda Szucsik, MSc, from University of Utah, Salt Lake City, UT, USA, for their kind advice about the microclip applier. We are also thankful to Dr Ismail El-Hamamsy, MD, at the Montreal Heart

Institute, for his precious time and advice about the surgical procedure. The authors gratefully acknowledge the statistical analyses by Lucie Blondeau M.Sc, and Mariève Cossette M.Sc, at the Montreal Health Innovations Coordinating Center (MHICC).

FUNDING

Dr. Tardif holds the Canada Research Chair in translational and personalized medicine and the Université de Montréal endowed research chair in atherosclerosis.

COMPETING INTEREST

Patents on the theme of HDL and both aortic valve stenosis and diastolic dysfunction were submitted by the Montreal Heart Institute and Drs Tardif and Rhéaume are mentioned as authors.

REFERENCES

1. Mottram PM, Marwick TH (2005) Assessment of diastolic function: what the general cardiologist needs to know. *Heart* 91: 681-695.
2. Satpathy C, Mishra TK, Satpathy R, Satpathy HK, Barone E (2006) Diagnosis and management of diastolic dysfunction and heart failure. *Am Fam Physician* 73: 841-846.
3. Masiha S, Sundstrom J, Lind L (2013) Inflammatory markers are associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in a population-based sample of elderly men and women. *J Hum Hypertens* 27: 13-17.
4. Douglas PS, Tallant B (1991) Hypertrophy, fibrosis and diastolic dysfunction in early canine experimental hypertension. *J Am Coll Cardiol* 17: 530-536.
5. Ma L, Gul R, Habibi J, Yang M, Pulakat L, et al. (2012) Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the transgenic (mRen2) rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2341-2351.

6. Murase T, Hattori T, Ohtake M, Abe M, Amakusa Y, et al. (2012) Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 35: 186-193.
7. Zile MR, Simsic JM (2000) Diastolic heart failure: diagnosis and treatment. *Clin Cornerstone* 3: 13-24.
8. Besler C, Heinrich K, Rohrer L, Doerries C, Riwanto M, et al. (2011) Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* 121: 2693-2708.
9. Tabet F, Rye KA (2009) High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. *Clin Sci (Lond)* 116: 87-98.
10. Amin R, Muthuramu I, Aboumsallem JP, Mishra M, Jacobs F, et al. (2017) Selective HDL-Raising Human Apo A-I Gene Therapy Counteracts Cardiac Hypertrophy, Reduces Myocardial Fibrosis, and Improves Cardiac Function in Mice with Chronic Pressure Overload. *Int J Mol Sci* 18.
11. Zhang ZY, Marrachelli VG, Thijs L, Yang WY, Wei FF, et al. (2016) Diastolic Left Ventricular Function in Relation to Circulating Metabolic Biomarkers in a General Population. *J Am Heart Assoc* 5: e002681.
12. Miao DM, Ye P, Xiao WK, Gao P, Zhang JY, et al. (2011) Influence of low high-density lipoprotein cholesterol on arterial stiffening and left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 13: 710-715.
13. Horio T, Miyazato J, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y (2003) Influence of low high-density lipoprotein cholesterol on left ventricular hypertrophy and diastolic function in essential hypertension. *Am J Hypertens* 16: 938-944.
14. Gordts SC, Van Craeyveld E, Muthuramu I, Singh N, Jacobs F, et al. (2012) Lipid Lowering and HDL Raising Gene Transfer Increase Endothelial Progenitor Cells, Enhance Myocardial Vascularity, and Improve Diastolic Function. *PLoS One* 7: e46849.
15. Gordts SC, Muthuramu I, Nefyodova E, Jacobs F, Van Craeyveld E, et al. (2013) Beneficial effects of selective HDL-raising gene transfer on survival, cardiac remodelling and cardiac function after myocardial infarction in mice. *Gene Ther* 20: 1053-1061.
16. Merlet N, Busseuil D, Mihalache-Avram T, Mecteau M, Shi Y, et al. (2016) HDL mimetic peptide CER-522 treatment regresses left ventricular diastolic dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *Int J Cardiol* 215: 364-371.
17. Zhang X, Javan H, Li L, Szucsik A, Zhang R, et al. (2013) A modified murine model for the study of reverse cardiac remodelling. *Exp Clin Cardiol* 18: e115-117.

18. Khan MLN DS, Crockatt JG, Dasseux JLH (2003) Single-dose intravenous infusion of ETC-642, a 22-Mer ApoA-I analogue and phospholipids complex, elevates HDL-C in atherosclerosis patients. . *circulation Suppl IV*: 563-564.
19. Busseuil D, Shi Y, Mecteau M, Brand G, Kernaléguen AE, et al. (2008) Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *Br J Pharmacol* 154: 765-773.
20. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
21. Nachar W, Busseuil D, Shi Y, Mihalache-Avram T, Mecteau M, et al. (2014) Optimisation of reference genes for gene-expression analysis in a rabbit model of left ventricular diastolic dysfunction. *PLoS One* 9: e89331.
22. Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, et al. (2004) Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation* 109: 97-102.
23. Fontes-Carvalho R, Sampaio F, Teixeira M, Rocha-Goncalves F, Gama V, et al. (2015) Left ventricular diastolic dysfunction and E/E' ratio as the strongest echocardiographic predictors of reduced exercise capacity after acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 38: 222-229.
24. Lee SW, Park MC, Park YB, Lee SK (2008) E/E' ratio is more sensitive than E/A ratio for detection of left ventricular diastolic dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17: 195-201.
25. Sharp AS, Tapp RJ, Thom SA, Francis DP, Hughes AD, et al. (2010) Tissue Doppler E/E' ratio is a powerful predictor of primary cardiac events in a hypertensive population: an ASCOT substudy. *Eur Heart J* 31: 747-752.
26. Dubi S, Arbel Y (2010) Large animal models for diastolic dysfunction and diastolic heart failure-a review of the literature. *Cardiovasc Pathol* 19: 147-152.
27. Horgan S, Watson C, Glezeva N, Baugh J (2014) Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction. *J Card Fail* 20: 984-995.
28. Trapeaux J, Busseuil D, Shi Y, Nobari S, Shustik D, et al. (2013) Improvement of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic therapy is associated with decreased aortic root and valve remodelling in mice. *Br J Pharmacol* 169: 1587-1599.
29. Tang J, Li D, Drake L, Yuan W, Deschaine S, et al. (2017) Influence of route of administration and lipidation of apolipoprotein A-I peptide on pharmacokinetics and cholesterol mobilization. *J Lipid Res* 58: 124-136.
30. Borthwick F, Warnakula S, Mangat R, Uwiera RR, Russell JC, et al. (2012) ApoA-1 infusion reduces arterial cholesterol and myocardial lesions in a rat model of cardiac dysfunction and insulin resistance. *Atherosclerosis* 222: 402-408.

Figure legends:

Figure 1:

Mitral inflow pattern in control, HCD, AAC and HCD-AAC rabbits during development period, assessed by (A) peak velocity during early left ventricular filling and (B) ratio between early LV filling and active atrial filling (E/A ratio). Time change between last value in progression period and baseline (Δ) was used to present figures. The data shown in these figures are mean and standard error (SE). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs Baseline and # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ vs Controls.

Figure 2:

LVDD parameters assessed by pulsed-wave and tissue Doppler echocardiography showing progression of the disease over time in HCD, AAC and HCD-AAC rabbits during development period vs. control rabbits. Time change between last value in progression period and baseline (Δ) was used to present figures. (A): Lateral E/Em ratio. (B): mitral A-wave (active atrial filling) duration *minus* left pulmonary venous reversed atrial flow (Ar) duration differences. (C): smallest left atrium dimension at end cardiac diastole (LADd) indexed to body weight (BW). The data shown in these figures are mean and standard error (SE). ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs Baseline and # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ vs Controls.

Figure 3:

LV hypertrophy (A), LV systolic function (B) and aortic valve function (C) assessed by Doppler-echocardiography in control, HCD, AAC and HCD-AAC rabbits during development period. Time change between last value in progression period and baseline (Δ) was used to present figures. BW:

body weight. The data shown in these figures are mean and standard error (SE). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs Baseline and # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$ vs Controls.

Figure 4: (A): Effects of apoA-I mimetic peptide complex addition on FC mass in depleted plasma after 2 hours of incubation at 37°C. (B): Dose response efflux from acetylated-LDL (AcLDL)-loaded J774 cells after addition of apoA-I mimetic. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

Figure 5:

Non-significant effects of 4-week apoA-I mimetic treatment on LVDD Doppler-echocardiography parameters in HCD rabbits (square), AAC rabbits (up-pointed triangle) and HCD-AAC rabbits (down-pointed triangle). (A): peak velocity during early left ventricular filling. (B): ratio between early LV filling and active atrial filling (E/A ratio). (C): lateral E/Em ratio and (D): mitral A-wave (active atrial filling) duration *minus* left pulmonary venous reversed atrial flow (Ar) duration differences. Results are expressed as adjusted means and standard error (SE). The common mean value \pm SE at baseline (hexagon) was not included into statistical analyses and is presented for information purposes only. Statistical analyses were made on different follow-up time points (w1, w2, w3 and end of study) and using a repeated measures ANCOVA models including terms for LVDD group, treatment, time and all their interactions as well as covariates for response variable at start of treatment-by-LVDD group interaction and response variable at start of treatment-by-LVDD group-by-time-interaction. Under the ANCOVA model, the comparisons between the adjusted mean in ApoA-I and the adjusted mean in Saline at the last follow-up time point within each of the three LVDD groups were performed. To simplify the figure, we only used values from start and end of treatment for LVDD echocardiographic parameters.

Figure 6:

Effect of apoA-I mimetic peptide treatment on cardiac inflammation assessed by histological LV sections (panel A) or molecular analysis (qPCR in LV homogenates after sacrifice) in the three LVDD-rabbit models. (A): Macrophage percentage in LV wall as revealed by RAM-11 antibody and immunohistochemistry, (B): *Vcam1* mRNA, (C): *Mmp12* mRNA, (D): *Timp1* mRNA, (E): *Mmp12/Timp1* mRNA ratio. The data shown in these figures are least square mean estimates and standard error (SE). The horizontal lines in panels B and D represent mean values of the control group (n=13) (solid line) \pm 95% confidence intervals (dotted lines). (For HCD, AAC and HCD-AAC groups respectively, n=6-6-9 for saline groups and 7-5-10 for apoA-I groups).

Figure 7:

Effect of apoA-I mimetic peptide treatment on cardiac inflammation assessed by histological LV sections or molecular analysis (qPCR in LV homogenates after sacrifice) in the three LVDD-rabbit models. (A): *Sod2* mRNA; (B): *Nox2* mRNA; (C) % of DHE positive staining normalized to DAPI staining. The data shown in these figures are least square mean estimates and standard error (SE). The horizontal lines represent mean values for the control group (n=13 for *Sod2* and *Nox2*, and n=12 for DHE) (solid line) \pm 95% confidence intervals (dotted lines). (For HCD, AAC and HCD-AAC groups respectively, n=6-6-9 for saline groups and 7-5-10 for apoA-I groups for *Sod2* and *Nox2*. For DHE, n=5-5-6 for saline groups and 7-5-8 for apoA-I groups.)

Figure 8:

Effect of apoA-I mimetic peptide treatment on cardiac fibrosis assessed by molecular analysis (qPCR in LV homogenates after sacrifice) in the three LVDD-rabbit models. (A): *Col1* mRNA;

(B): *Col3* mRNA; (C) *Col1/Col3* mRNA ratio. The horizontal lines represent mean values for the control group (n=13) (solid line) \pm 95% confidence intervals (dotted lines). (For HCD, AAC and HCD-AAC groups respectively, n=6-6-9 for saline groups and 7-5-10 for apoA-I groups). The data shown in these figures are least square mean estimates and standard error (SE).

Supplementary figure S1:

Detailed experimental protocols used in the study. Rabbits were randomized to receive saline or apoA-I infusions after LVDD progression.

Figure 1

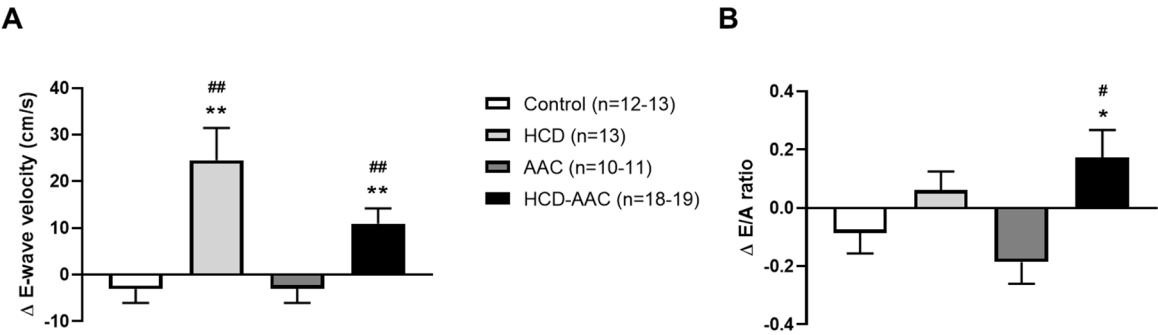


Figure 2

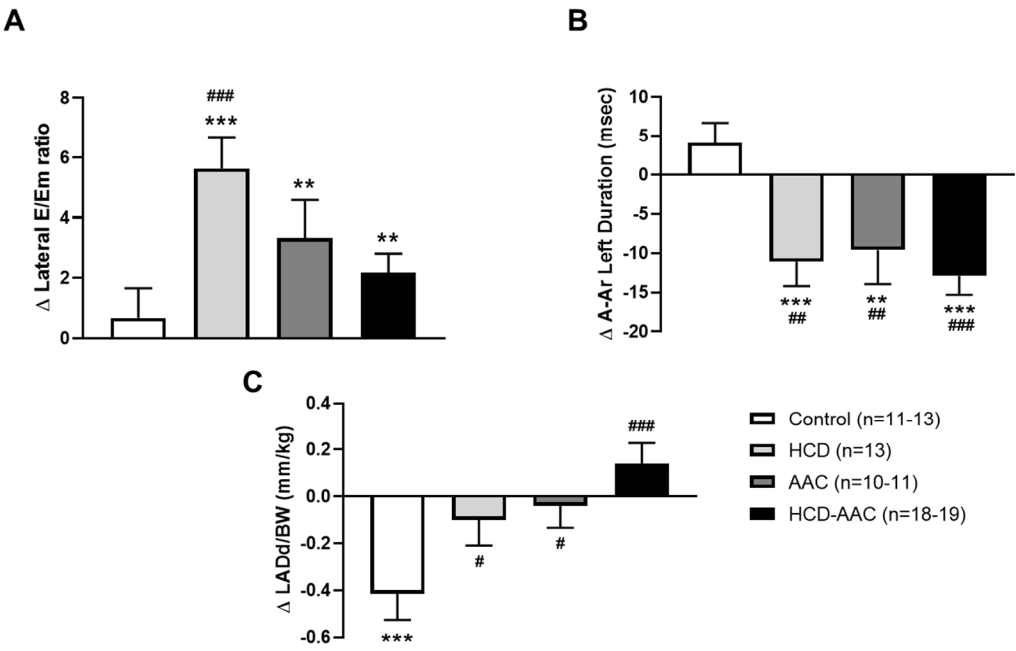


Figure 3

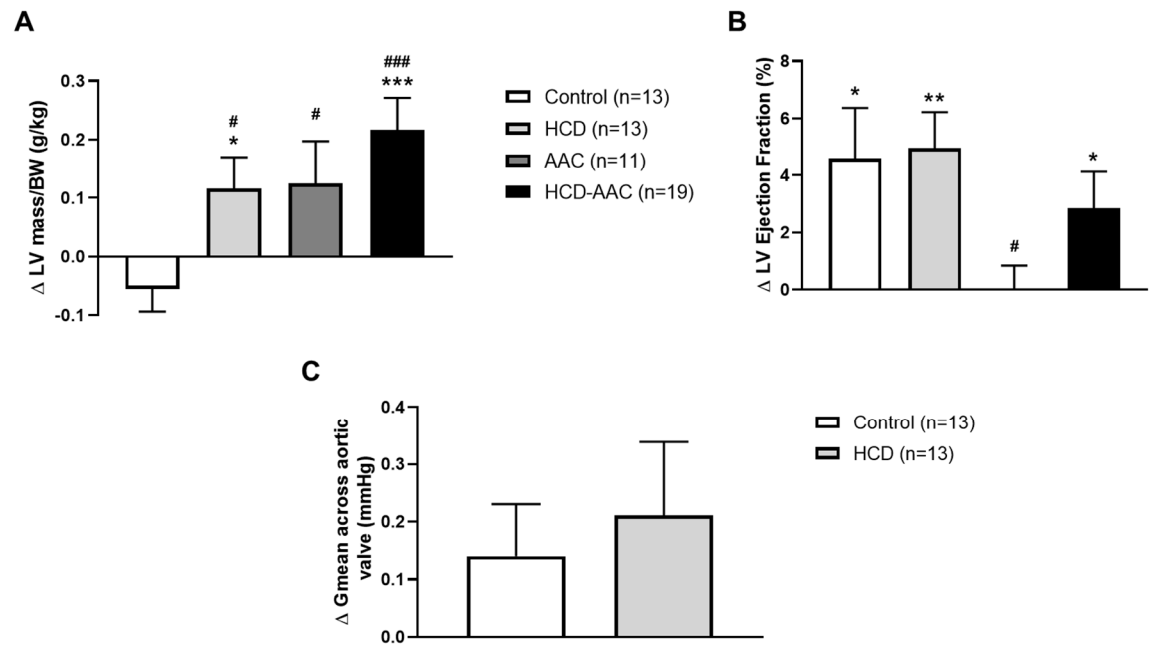


Figure 4

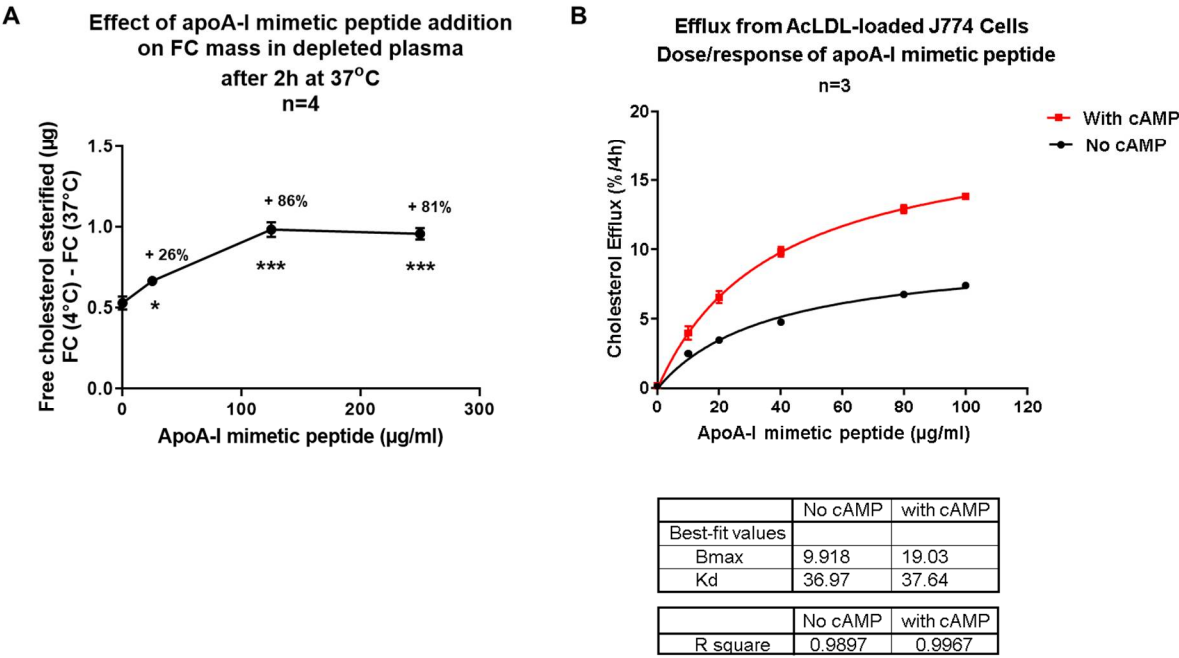


Figure 5

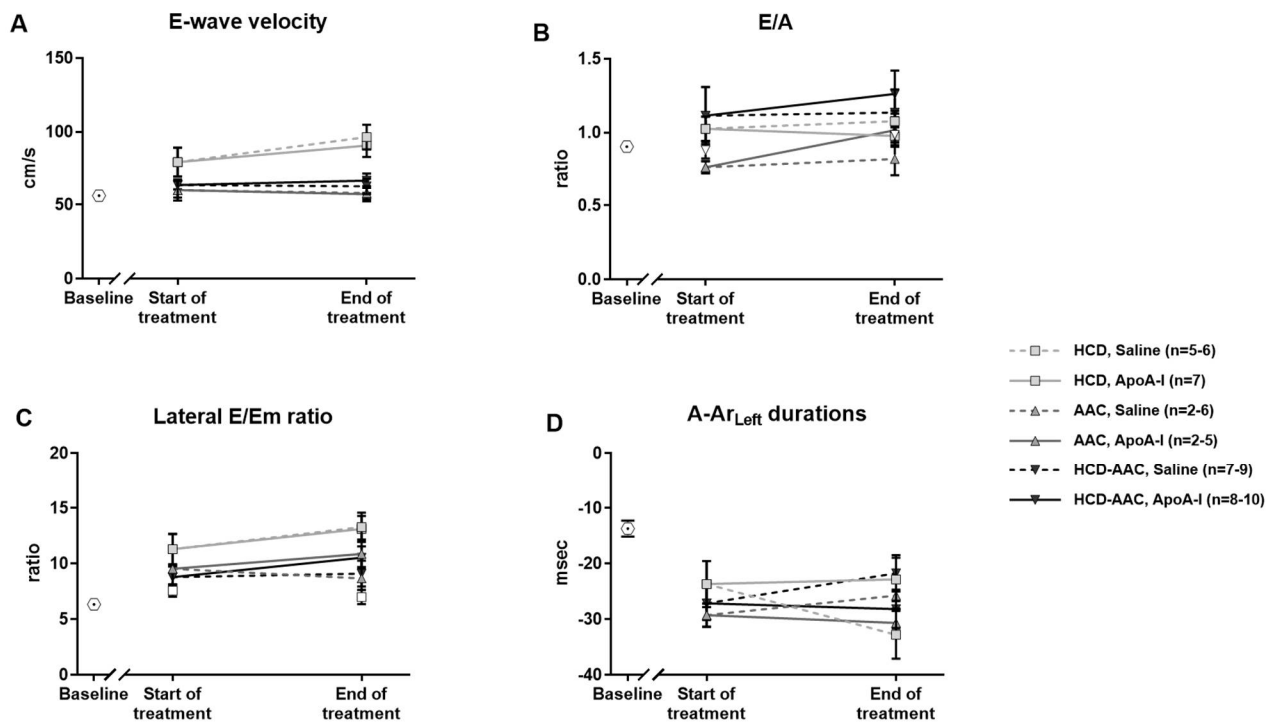


Figure 6

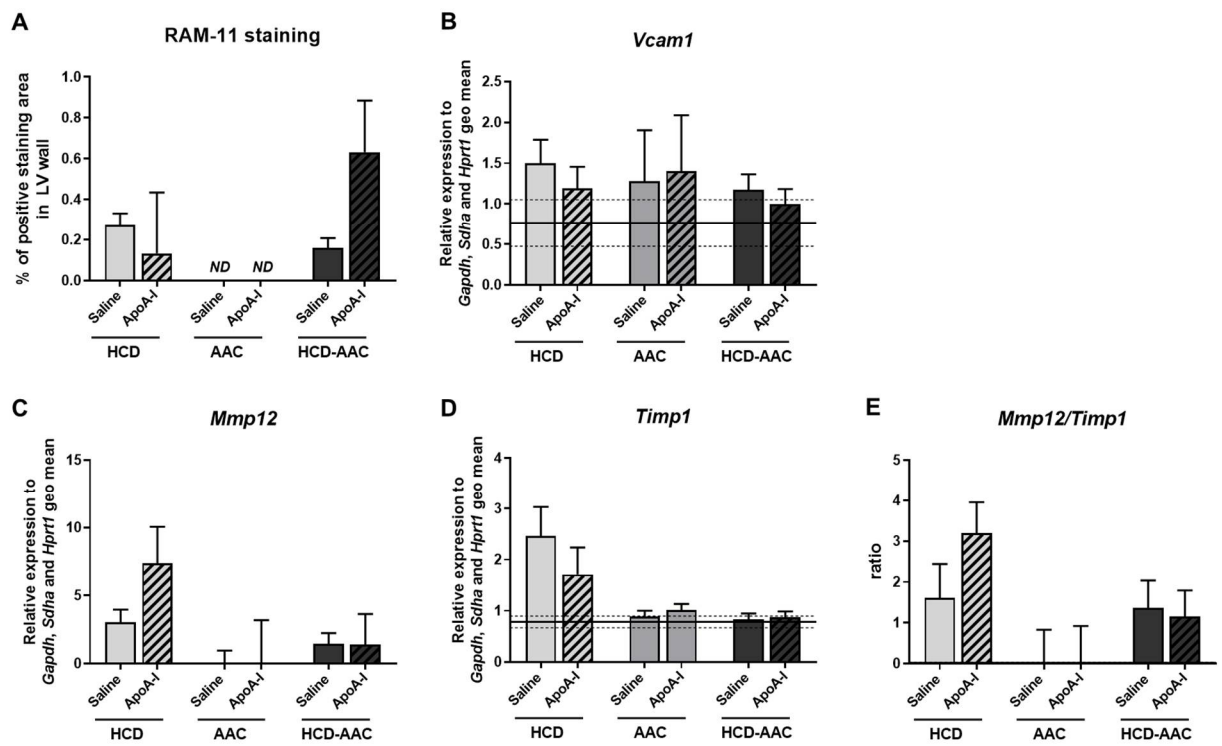


Figure 7

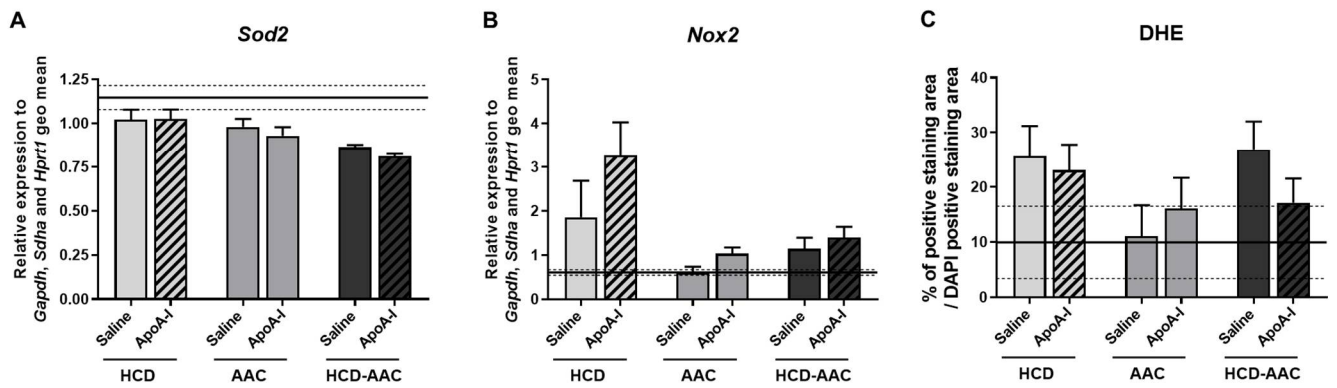
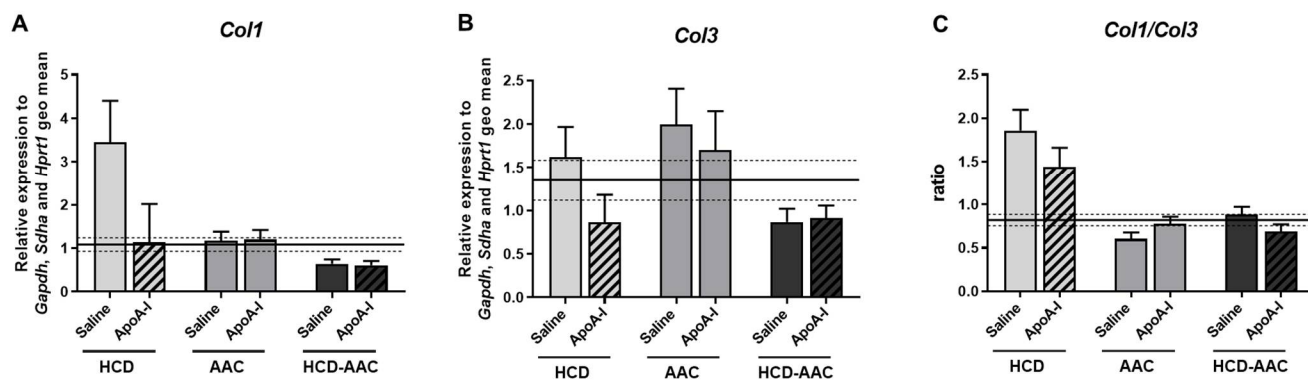


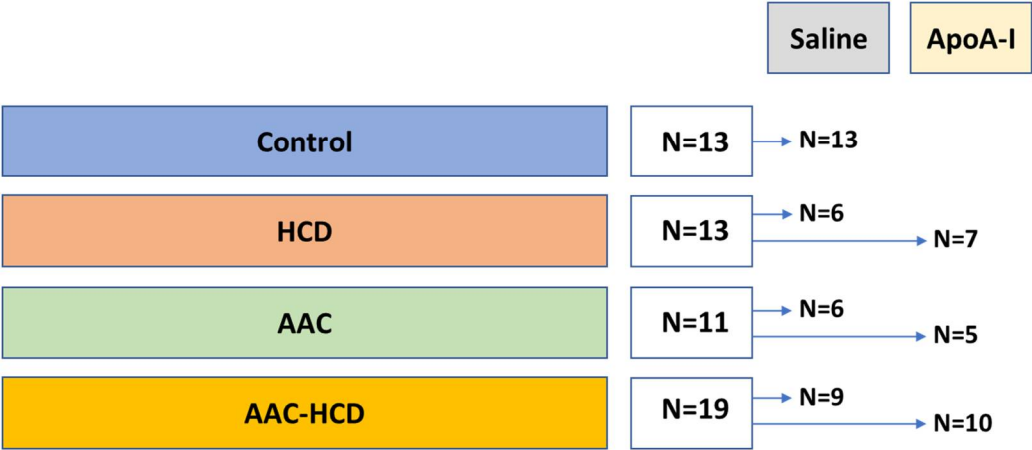
Figure 8



Supplementary Table S1: Forward and reverse primers of housekeeping genes and genes of interest

Gene Symbol	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Gapdh</i>	NM_001082253	TGGTGAAGGTCGGAGTGAAC	ATGTAGTGGAGGTCAATGAATGG
<i>Hprt1</i>	NM_001105671	CCTTGGTCAAGCAGTATAATC	GGGCATATCCTACAACAAAC
<i>Sdha</i>	XM_017339216	GGACCAGGACGCCATCCACTAC	TCCACCGAACGCACGCTGATAG
<i>Vcam1</i>	NM_001082152	GAACTTCTCGTGCTCTATTGTG	TGTGCTTCTACCAGACTGTATG
<i>Mmp12</i>	NM_001082771	GGCAACTGGACACATCTAC	GGCATACTCAACATCCTCAC
<i>Timp1</i>	NM_001082232	CTCATCGCTGGACAACCTG	GCGTAGGTCTTGGTGAAG
<i>Nox2</i>	NM_001082100	AATGCTTGTGGCTGTGATAAG	TACCAGACTGACTTGAGGATG
<i>Sod2</i>	XM_008263745	CAAACCTGAGCCCTAACG	TGTTCCACACATCAATCC
<i>Col 1</i>	XM_017348831	AGCCAGCAGATTGAGAAC	TCGCAGAAGACCTTGATG
<i>Col 3</i>	XM_002712333	CCTGAAGCCCCAGCAGAAAATTG	AGTTGGTCACTTGTACTGGTTGAC

Supplementary Figure S1



Chapitre IV: Discussion

L'ICFEP est une maladie présentant une physiopathologie complexe. Bien que cette forme d'IC ait été ignorée pendant une longue période, l'intérêt à comprendre les mécanismes impliqués dans cette pathologie a augmenté depuis les vingt dernières années. En effet, la DD étant la composante principale de l'ICFEP, environ 62 600 articles ont été publiés jusqu'en 2000 portant sur ce terme. Cependant, entre les années 2000 et 2018, 294 000 articles sont retrouvés sur "Google Scholar" en lien avec la DD. La contribution de plusieurs voies moléculaires est de plus en plus claire dans cette maladie. En effet, l'hypertrophie ventriculaire et la fibrose cardiaque sont parmi les plus connues [234, 235]. Le métabolisme du calcium et l'inflammation sont également impliqués d'une façon importante dans la DD (voir les sections 1.2.9.1 et 1.2.9.5 de l'introduction) [79].

Le développement de modèles expérimentaux est le point de départ pour étudier la physiopathologie des maladies. Par exemple, plusieurs modèles cellulaires et animaux ont permis de comprendre les voies moléculaires principales derrière l'athérosclérose. Cependant, pour la DD, le nombre de modèles animaux demeure restreint [236] et ne reflète pas suffisamment bien la physiopathologie complexe de la DD. En effet, l'implication de plusieurs voies physiologiques dans la maladie de la DD rend de plus en plus difficile le développement et/ou la sélection d'un modèle animal adéquat pour l'étude de cette pathologie. Dans notre article de revue, nous avons présenté les différents modèles connus dans le contexte de la DD. Leur classification a été faite selon le facteur de risque ou bien selon l'espèce animale. Dépendamment de l'étude en question, le choix du modèle doit être fait d'une façon bien déterminée. Cette revue de la littérature aidera les chercheurs à cibler la voie moléculaire ou bien la cause principale menant à la DD. En utilisant cette stratégie, le développement de traitement contre cette maladie devient plus approprié et efficace. De plus, plusieurs techniques ne sont pas optimales avec certains modèles. Nous avons également énuméré les avantages et les inconvénients de chaque modèle afin de faciliter le choix de ce dernier.

L'utilisation du lapin dans nos études repose sur plusieurs points importants. Premièrement, la progression de la DD chez le lapin avec le temps a été considérée adéquate pour étudier la progression de la DD chez l'humain [237]. Cette étude a montré la compatibilité et la reproductibilité des mesures échocardiographiques chez le lapin avec la technique utilisée en clinique. Aussi, la taille moyenne du lapin le rend facile à manipuler (comparé aux chiens ou aux porcs par exemple) tout en ayant une bonne quantité de tissus qui pourrait être utilisé dans les analyses ex vivo comparé aux rongeurs. Deuxièmement, l'expertise de notre laboratoire avec ce type d'animaux a été établie et raffinée au fil des treize dernières années. Les protocoles d'administration de l'anesthésie, les prises de sang, les sacrifices et les injections de l'apoA-I dans les veines de l'oreille ont subi plusieurs mises au point et sont faits d'une façon optimale [70, 168, 175, 231]. Troisièmement, afin de comparer nos résultats avec les résultats des études antérieures obtenus sur la SVA, il était préférable d'utiliser le lapin. Finalement, chez le lapin le rythme cardiaque est plus bas que chez les petits rongeurs. C'est une variable qui pourrait affecter les mesures d'échocardiographie des paramètres de la DD. Bien que le génome incomplet du lapin et la quantité limitée d'anticorps contre les protéines du lapin soient des inconvénients de ce modèle, le développement de cet aspect chez cette espèce ne cesse de s'accroître. En effet, nous possédons maintenant dans notre laboratoire un grand inventaire d'amorces d'ADN validées pour les études d'expression par qPCR ainsi que plusieurs anticorps spécifiques contre les épitopes de lapin.

Dans la présente étude, nous avons utilisé deux protocoles différents, soit le lapin exposé à une diète riche en cholestérol seulement ou le modèle chirurgical de constriction aortique avec ou sans une diète riche en cholestérol. Dans le premier modèle, les lapins ont suivi un protocole de développement de la DD selon un temps fixe prédéterminé (12 semaines) en se basant sur les études de la littérature [87]. Nous avons alors remarqué que cette période n'était pas suffisante pour développer une DD sévère à modérée telle que souhaitée. Nous avons alors décidé d'introduire une nouvelle composante à ce protocole qui est l'ajout d'un suivi hebdomadaire du stade de la DD par échocardiographie. Le ratio E/Em a été choisi puisqu'il s'agit d'un paramètre révélateur du stade de la DD dans les études de comparaison entre l'échocardiographie et les mesures invasives obtenues par un cathéter. Une valeur plus que la moyenne + 2 SD (écart type) de la valeur des lapins au point de départ était considérée comme seuil pour prédire l'installation significative de la DD et permettre le passage au traitement. Une durée moyenne de 16 semaines

de diète 0.5% riche en cholestérol était nécessaire pour atteindre notre objectif. L'avantage de cette durée prolongée de ladite diète est pour assurer que la maladie a été bel et bien établie. De plus, avec ce protocole les lapins seront amenés à un stade de la DD plus homogène. En effet, dans les études cliniques d'envergure, le nombre de patients utilisés est très élevé. Cet aspect donne de la puissance aux tests statistiques et réduit l'impact de la variation biologique entre les individus. Pour des questions éthiques et budgétaires, il est impossible d'utiliser un très grand nombre d'animaux dans les études pré-cliniques. Cependant, la variation biologique chez ces animaux est plus ou moins comparable à celle trouvée chez l'humain. Cela dit, l'utilisation d'une stratégie qui classe les lapins avant de leur donner le traitement aide à diminuer l'ampleur de ce type de variation. De plus, la randomisation des groupes a été faite d'une façon à ce que tous les groupes présentent une durée comparable pour le développement de la DD. En se basant sur les données échocardiographiques, les lapins exposés à la diète riche en cholestérol ont développé une DD restrictive. En effet, la vitesse de l'onde E, le taux de décélération de cette onde E, le ratio E/Em, et la durée de la régurgitation de l'onde A (Ar) ont significativement augmentés avec le temps. Ces résultats sont comparables aux valeurs de la DD obtenues dans notre modèle de SVA avec vitamine D2 [175]. Aussi, une hypertrophie ventriculaire représentée par l'augmentation du ratio de la masse du ventricule gauche sur le poids corporel a été remarquée chez ces lapins. Cette hypertrophie est accompagnée par une augmentation de l'ARNm du gène du BNP. Le BNP est le marqueur le plus robuste dans le diagnostic de l'IC [238]. Son augmentation porte un rôle protecteur contre la vasoconstriction et la rétention hydro-sodique induite entre autres par la voie du RAAS. Le point le plus important du modèle est l'absence de la SVA. L'aire de la valve ainsi que les gradients de pression à travers la valve aortique de nos lapins n'étaient pas significativement affectées chez le groupe hyperchol comparé au groupe placebo. Ces résultats appuient la conclusion de l'étude faite chez le lapin indiquant la nécessité d'ajouter la vitamine D2 à la diète afin d'induire la SVA. Il n'est pas clair si la vitamine D2 augmente l'absorption du cholestérol ou bien si elle agit sur le métabolisme du cholestérol. Cependant, il a été démontré que les métabolites de la vitamine D agissent sur l'intégrité des artères et induisent une plus grande rétention lipidique par les artères [239, 240]. La vitamine D pourrait également induire la calcification par la voie dépendante du Bmp-2 et Runx-2. D'un autre côté, des études montrent

une augmentation du risque de développement de la SVA calcifiée lors d'une déficience en récepteur de la vitamine D [241].

La quantification génique par qPCR a montré une augmentation des gènes de la fibrose (Tgf- β 1, Col I et ratio Col I/III) dans notre modèle de lapin. Cependant, au niveau protéique en histologie, la coloration de trichrome de Masson n'a pas montré un effet significatif entre les groupes de lapins. Cela pourrait être expliqué par un début du processus de fibrose. Le changement commence au niveau basal avec les ARNm pour atteindre ensuite le niveau protéique. Aussi, l'augmentation de la présence des protéases, telles que les MMPs par exemple, pourrait contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire et la diminution de la présence de collagène [242]. Nous avons obtenu une augmentation du statut inflammatoire dans nos lapins hypercholestérolémiques versus les contrôles. En effet, des augmentations de l'expression de l'ARNm de Vcam-1 et de la Mmp-12 ont été observées par qPCR. De plus, le niveau de CRP sérique ainsi que la quantification par immunohistochimie des macrophages (par le marquage de RAM-11) ont été augmentés chez ces lapins hypercholestérolémiques. L'implication de l'inflammation dans la DD est de plus en plus étudiée et constitue un point important dans notre modèle de DD médié par les lipides [82, 243]. Finalement, le stress oxydant était testé via l'expression des gènes de l'enzyme antioxydante de la superoxyde dismutase (Sod2) et la sous-unité (Nox-2) de l'enzyme pro-oxydante NADPH. Multiples études ont montré l'implication de l'inflammation et de l'oxydation dans la DD [244, 245]. Des corrélations entre les cytokines inflammatoires (TNF- α et Il-6) et les paramètres d'échocardiographie de la DD ont été démontrées [246]. Les cytokines inflammatoires contribuent au remodelage du VG et à la progression de l'IC en influençant la contractilité cardiaque, en induisant une hypertrophie et en favorisant l'apoptose et la fibrose des myocytes [247, 248]. Le blocage de l'IL-1 par l'anakinra (approuvé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde) a montré une amélioration de la DD chez les patients atteints d'une ICFEP [125]. En effet, des injections de 100 mg par jour d'anakinra pendant 14 jours étaient suffisantes pour avoir un effet significatif sur la tolérance à l'exercice et sur la diminution de l'inflammation tel que présenté par la baisse de 84% de la CRP circulante vs 10% chez les placebo [125]. Cela dit, des traitements avec des effets pléiotropes anti-inflammatoires et anti-oxydants, entre autres, sont donc possiblement bénéfiques pour l'amélioration de la DD.

Le deuxième modèle de lapins était chirurgical avec l'installation d'un clip au niveau de l'aorte ascendante (TAC). Ce clip réduit la lumière de cette dernière et crée une surcharge de pression sur le ventricule gauche. Le modèle de TAC mime ainsi le rétrécissement de la valve aortique qui pourrait causer la DD. Nous avons utilisé ce modèle pour plusieurs raisons. Premièrement, il s'agit d'un modèle de lapin sans facteurs confondants. Tel que mentionné auparavant, dans nos études antérieures, nous avons détecté une amélioration de la DD dans un modèle de SVA chez le lapin à la suite d'un traitement avec un mimétique de l'apoA-I [175]. Cependant, l'amélioration de la DD corrélait avec certains paramètres de la SVA par les mesures échocardiographiques. En effet, l'augmentation de l'aire de la valve aortique corrélait positivement et significativement avec le temps de décélération de l'onde E ainsi qu'avec la durée de l'onde A moins la durée de la régurgitation de l'onde A (A-Ar). Il était alors nécessaire d'utiliser un modèle de DD n'impliquant pas la SVA pour pouvoir tester l'effet de ces thérapies sur une DD isolée. Ce modèle a été exposé à une diète riche en cholestérol ou bien à une diète normale. L'effet de la chirurgie sur la DD n'était pas amplifié par la présence de la diète riche en cholestérol lorsque comparé aux groupes TAC exposés à la diète normale. Ceci pourrait être dû à la courte période de cette diète (12 semaines seulement) ou même à des petites variations techniques au niveau du degré de la constriction induites par la pose du clip. L'avantage donc de ce modèle est qu'il permet d'étudier l'effet isolé d'un traitement sur la DD sans implication d'autres facteurs concomitants, tel qu'une diminution de l'aire d'ouverture de la valve aortique. Les points faibles de ce modèle se résument par : l'aspect chirurgical qui induit des processus inflammatoires et un plus grand risque de mortalité chez les animaux; l'aspect technique plus difficile et la variabilité liée au pourcentage de la constriction aortique.

Les traitements contre la DD sont peu efficaces. Plusieurs molécules utilisées dans l'ICFER ont été essayées au niveau de l'ICFEP sans succès. La croissance du nombre de patients souffrant de l'ICFEP est en continue. Le besoin d'une médication contre cette pathologie devient de plus en plus urgent, surtout que les taux de morbidité et de mortalité des deux formes de l'IC sont presque équivalents. Dans une ancienne étude de notre laboratoire, nous avons démontré une amélioration de la DD à la suite d'infusions d'un mimétique de l'apoA-I, composante principale des HDL, le CER-522. Dans la présente étude, nous avons utilisé un autre mimétique de l'apoA-I.. En effet, des hélices α amphipatiques composés de 22 a.a. ont été complexés avec des phospholipides (1,2-

dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)) et de la sphingomyéline (ratio 1 :1 :1). Ce composé recrée essentiellement l'ETC-642. Ce dernier a été utilisé dans différentes études antérieures et a montré, ainsi que d'autres mimétiques de l'apoA-I, une bonne capacité de diminuer l'inflammation et le stress oxydant [192, 230, 249, 250]. Une préparation identique à ce qui a été infusée aux lapins a été testée *in vitro* afin de valider l'effet de l'ETC-642 sur l'activation de la LCAT ainsi que sur l'efflux. L'ETC-642 ressemble à des particules de préβ-HDL et peut induire l'efflux de cholestérol en général mais surtout celui dépendant d'ABCA-1. Nous avons utilisé la dose de 25 mg/kg afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux de notre étude précédente chez le lapin [231]. Aussi, les transaminases hépatiques, l'AST et l'ALT, n'ont pas subies des augmentations significatives comparé au placebo, ce qui démontre la bonne tolérance de cette dose chez le lapin. La période du traitement était d'un total de 4 semaines à la fréquence de 3 infusions par semaine. Dans notre précédente étude [175] où nous avons obtenu beaucoup de paramètres qui montraient une tendance à changer mais sans atteindre le seuil de la significativité, la période du traitement était de 2 semaines au lieu de 4 semaines. En effet, plusieurs voies moléculaires ont été testées dans ces études. La fibrose, l'inflammation et le stress oxydatif en faisait partie. Les gènes de la collagène 1 et 3, le Tgf-β1, les cytokines inflammatoires, la superoxyde dismutase et la NADPH oxydase ont été testé que ça soit par qPCR ou bien par des analyses histologiques et immunohistochimiques. Nous avons alors choisi une plus grande durée de traitement afin de nous donner une meilleure probabilité de découvrir un effet significatif. De plus, les animaux des études antérieures avaient reçu une diète normale durant les semaines du traitement. Nous avons aussi remarqué que l'arrêt de la diète riche en cholestérol pourrait amener un facteur confondant (baisse importante du taux de cholestérol dans le sang) sur la cause de l'amélioration de la pathologie à la suite du traitement. Nous avons alors décidé d'utiliser une diète moins riche en cholestérol (0.2% au lieu de 0.5%) plutôt que d'arrêter complètement la diète avec cholestérol. L'impact de cette diète sur le taux de cholestérol circulant, reflète plus franchement la réduction de cholestérolémie chez les patients qui reçoivent un diagnostic de maladies cardiovasculaires causées par des taux de cholestérol élevés. Les résultats d'échocardiographie n'ont pas montré un effet significatif à la fin du traitement entre le groupe placebo et le groupe ApoA-I. Cela suggère que l'effet retrouvé sur la DD dans notre précédente étude était lié à l'amélioration de la SVA. En qPCR, nous n'avons pas obtenu des changements significatifs de l'expression des gènes de la fibrose (Col I, Col III et

leur ratio).. Ces résultats ont également été confirmés au niveau protéique en histologie. Cependant, les effets anti-inflammatoires de l'ETC-642 étaient les plus remarquables. En effet, une baisse numérique (normalisation) des taux sériques de la protéine C-réactive (CRP), marqueur important du statut inflammatoire, a été obtenue dans notre modèle de diète prolongée chez le groupe traité à l'apoA-I comparé au groupe placebo. Une corrélation inverse entre les niveaux de l'apoA-I sérique et les taux de CRP a été démontrée dans différentes études [251, 252]. De plus, la quantification du RAM-11 a été diminuée chez le groupe traité à l'apoA-I comparé au placebo. Cette réduction est en ligne avec l'effet anti-inflammatoire que l'ETC-642 possède. Le RAM-11 est un anticorps monoclonal de souris utilisé chez le lapin pour détecter les macrophages. Cet anticorps n'est probablement pas spécifique pour un type spécifique des macrophages, comme les macrophages polarisés M1 ou les M2 par exemple. Les études sur les macrophages montrent de plus en plus de différences entre les sous-populations de macrophages [253]. En effet, les deux catégories les plus connues sont les M1 (pro-inflammatoires) et les M2 (réparateurs). Ces macrophages possèdent des phénotypes et des rôles très différents [254]. Dans l'IC, ce volet n'a pas encore été bien élaboré. Cependant, en athérosclérose, les études montrent une augmentation des macrophages M1 dans les stades primaires de la formation de la plaque. Pour leur part, les M2 sont plus retrouvés dans les phases réparatrices et jouent un rôle "anti-inflammatoire". Certains chercheurs prédisent que dépendamment du milieu extracellulaire de la région inflammatoire, le type de macrophages pourrait changer. Ainsi, dans les études cellulaires *in vitro*, une incubation des monocytes différenciés (M0) avec du TNF- α polarise les M0 en M1. Cependant, une incubation de M0 en présence de l'IL-4 polarise les M0 en M2. Les HDL et les mimétiques de l'apoA-I ont démontré une capacité significative de diminuer les lésions d'athérosclérose et l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1. Dans notre étude, l'effet anti-inflammatoire de l'ETC-642 est bel et bien remarqué au niveau moléculaire. Cependant, ces effets étaient absents sur la DD sur le plan fonctionnel (par l'absence de l'effet significatif sur les paramètres d'échocardiographie). Une hypothèse pourrait être émise quant à la durée nécessaire pour avoir un effet positif du traitement sur la fonctionnalité du cœur. Cependant, rien ne garantit qu'un tel effet soit retrouvé après une plus longue durée de traitement. Dans la présente étude, nous avons doublé la période du traitement en comparaison avec les études précédentes. Malgré cela, nous n'avons pas trouvé un meilleur effet lié à cette extension de traitement.

Aussi, dans une autre étude, nous avons testé l'ETC-642 dans un modèle de DD chez le rat avec un syndrome métabolique. Ce modèle avait déjà été décrit dans la littérature et développait une DD sans présence de SVA ou de dysfonction systolique [255]. Nous avons choisi de ne pas le présenter dans cette thèse afin de simplifier le contenu et de se concentrer sur les modèles de lapins utilisés. Dans cette étude, les rats étaient obèses et hypertendus avec une résistance à l'insuline. La comparaison entre les rats obèses traités avec de l'ETC-642 versus placebo n'a pas montré un effet bénéfique significatif entre les groupes. Plusieurs mécanismes ont été testés et les effets du traitement ne montraient pas de différence claire versus le placebo. Il s'agit alors d'un autre modèle de DD sans SVA qui n'a pas montré des résultats positifs de notre traitement sur cette pathologie. Nous sommes plus d'avis que le rôle principal de notre mimétique obtenu dans nos études de DD est plutôt lié à l'amélioration de la SVA. Il est de grande importance d'approfondir nos connaissances sur les voies moléculaires qui sont impliquées dans cette pathologie.

Il est important de noter qu'il existe quelques différences entre les deux mimétiques que nous avons utilisés dans les études de la DD et de la SVA, soit le CER-522 et l'ETC-642. Bien qu'ils soient composés de 22 acides aminés sous forme d'hélices α , la séquence peptidique des deux mimétiques n'est pas la même. En effet, aux positions deux glutamines (Q) du CER-522 sont substituées par deux acide glutamique (E) dans l'ETC-642. Cependant, le CER-522 présente au niveau de son C-terminal un acide aminé non-naturel (L'acide isonipécotique) à la place de la proline de l'ETC-642. La charge et l'hydrophobicité des deux mimétiques ne sont donc pas les mêmes ce qui peut affecter leurs propriétés, notamment celles anti-inflammatoires [256]. La proline de l'ETC-642 permet de donner un angle (nommée "coude") à l'hélice α , permettant ainsi un meilleur repliement entre les différentes hélices du mimétique. Par contre, l'acide isonipécotique donne une meilleure résistance au mimétique contre la dégradation.

D'un autre côté, l'ETC-642 contient du DPPC et de la sphingomyéline alors que le CER-522 contient 3% de dipalmitoyl phosphatidyl glycérol (DPPG) de plus que les deux autres composants (48.5% DPPC et 48.5% de sphingomyéline). Des études ont montré que la différence dans la composition des rHDL en phospholipides pourrait influencer leurs effets sur les molécules d'adhésion aux cellules endothéliales [256]. Aussi, la présence des résidus de cystéine (C) et d'histidine (H) peut également être impliqué dans les effets anti-oxydants des mimétiques [257].

Or, nos deux mimétiques n'en contiennent aucun de ces deux a.a. Il n'y a donc pas d'indices clairs et prouvés qui pourrait favoriser l'utilisation de l'un ou l'autre des deux mimétiques en question dans le traitement de la DD.

Plusieurs autres variables méritent également d'être discutées. En effet, un niveau bas de HDL-C représente un prédicteur de maladies cardiovasculaires. Il serait alors intéressant de tester l'effet préventif des mimétique de l'apoA-I ou bien des HDL sur la DD. L'objectif serait alors d'administrer le mimétique versus le placebo depuis le début du protocole et évaluer l'effet du traitement sur le degré de l'évolution de la DD avec le temps. Les HDL et leurs mimétiques ont des rôles protecteurs contre l'oxydation des LDL, la biodisponibilité du NO et l'accumulation des cristaux de cholestérol au niveau des artères [258, 259]. Ces effets pourraient améliorer significativement le risque de développement de la DD et des maladies coronariennes en général. En effet, un pré-traitement des cellules épithéliales de l'intestin (T84) aux HDL et l'apoA-I a montré une réduction de l'expression de TNF- α et de l'IL-8 [260]. De plus, un pré-traitement de cardiomyocytes de rats (H9C2) a diminué la formation des ROS à travers la diminution de la NADPH oxydase [261]. À notre connaissance, ce type de traitement n'a pas encore été tenté dans la DD.

Une autre variable à considérer dans ce type de traitement est la voie d'administration de l'apoA-I ou des HDL. En effet, des études ont montré un effet bénéfique d'un HDL reconstitué sur la DD lorsqu'injecté au niveau du péritoine (intra-péritonéale) [177]. Dans l'étude de Borthwick et al, des rats obèses insulino-résistants ont reçu 3 doses consécutives d'un HDL reconstitué (rHDL) composé d'apoA-I complète isolée à partir de plasma humain. Une diminution de la vitesse de l'onde E ainsi que le ratio E/A ont été obtenus par échocardiographie 7 jours après la dernière injection du rHDL. Selon nous, l'utilisation d'autres paramètres, comme par exemple le ratio E/Em obtenu par la modalité du doppler tissulaire aurait dû être rapporté par les auteurs. L'effet principale de ce traitement a été démontré par une diminution de l'absorption et de l'accumulation du cholestérol dans les vaisseaux des rats en ex-vivo. Cette étude diffère de notre étude puisqu'elle se base sur un traitement à court terme (3 jours consécutives vs 4 semaines). En plus, la dose utilisée était très faible ce qui représente des coûts moins élevés au traitement. Cependant, la synthèse d'un peptide mimétique de 22 a.a. est moins coûteuse que l'utilisation (par

isolation du plasma humain) ou bien la synthèse de la ApoA-I complète (full length), sans parler de sa résistance plus élevée à la dégradation par les protéases.

La composition ou bien la richesse de l'apoA-I et de ses mimétiques en lipides pourrait également jouer un rôle important dans l'ampleur de leurs effets. Un mimétique de l'apoA-I sans lipides a été comparé au même mimétique reconstitué avec des phospholipides. La biodisponibilité de l'apoA-I dans la circulation a été testée après une injection de ces particules par voie intraveineuse (IV) ou bien par voie intrapéritonéale (IP). L'augmentation du cholestérol libre plasmatique était de l'ordre de 5.3 fois à la suite de l'injection IV du mimétique reconstitué vs 1.8 fois à la suite de l'injection IP du mimétique reconstitué ainsi que les deux voies d'administration du mimétique pauvre en lipides [262]. En d'autres termes, la meilleure réponse a été obtenue dans le groupe IV du mimétique complexé avec des phospholipides. Cette combinaison a été utilisée dans nos études où les lapins ont reçu l'ETC-642 (qui est un peptide complexé avec phospholipides) par la veine de l'oreille (IV).

Donc, l'effet le plus important que nous avons obtenu au niveau de notre étude se résume par une diminution de l'inflammation dans le modèle de lapin étudié dans le présent ouvrage. Vu que les données fonctionnelles d'échocardiographie n'ont pas montré une amélioration de la DD par le traitement, et ce dans différentes études (lapins et rats), nous constatons que les effets de l'apoA-I déjà obtenus dans les études antérieures sont propre à l'amélioration de la SVA. Le taux de cholestérol total de nos lapins exposés à la diète hypercholestérolémique était augmenté d'environ 10 fois. Il y a une possibilité que les particules de l'ETC-642 soient liées aux LDL et VLDL ce qui peut diminuer leur efficacité et neutraliser leur effet dans le modèle. Cependant, dans un des modèles de TAC que nous avons étudié, une diète normale a été donnée aux lapins pendant toute la durée de l'étude. Cela dit, dans ce modèle, les lapins n'avaient pas d'accumulation de particules LDL et VLDL. L'effet de notre traitement n'a pas montré des effets significatifs sur la DD en échocardiographie. Donc, l'hypothèse que l'effet de l'ETC-642 soit neutralisé par la présence abondante des particules LDL et VLDL devient moins probable.

En conclusion, le mimétique de l'apoA-I que nous avons utilisé dans notre présente étude n'améliore pas significativement la DD chez le lapin expérimental en absence de la SVA. Des études testant l'effet de ces traitements sur la progression de la DD devrait être envisagées et

pourraient avoir un impact très important sur l'avancement des connaissances dans le traitement de cette maladie.

Limitations et perspectives

Cette étude comporte plusieurs limitations que ça soit au niveau technique ou au niveau scientifique. En effet, tel que discuté dans la section (1.2.5.2) de l'introduction, l'utilisation de la composante Doppler en 2D en échocardiographie pourrait induire une fausse interprétation de résultats. Ces résultats pourraient être validés par des mesures hémodynamiques à l'aide d'un cathéter pression/volume. Aussi, l'utilisation d'un agent anesthésiant dans ces expériences induit une baisse de la fréquence cardiaque chez les lapins et pourrait affecter la comparaison des résultats avec ceux de l'humain (qui lui reste réveillé dans l'échocardiographie). Il n'est pas impossible de réaliser les sessions d'échocardiographie chez le lapin réveillé. Toutefois, pour le faire, il faut une longue période de conditionnement des lapins à ce type d'expérience. D'autres limitations pourraient être soulevées dans le modèle de constriction aortique (TAC). Pendant la pose du clip au niveau de l'aorte ascendante, le degré de la constriction ainsi que la région où le clip est posé peuvent légèrement différer d'un lapin à l'autre donnant un degré de maladie qui n'est pas semblable entre les animaux. La même nature de problème pourrait être soulevée chez les lapins exposés à la diète riche en cholestérol. La nourriture est présentée à volonté à ces lapins. Certains animaux peuvent alors avoir un plus grand apport journalier de cholestérol comparé à d'autres. La pesée de la nourriture est faisable. Cependant, il y'aura toujours des animaux qui mangeraient moins que la moyenne. Cela dit, il faut pratiquement donner une quantité de nourriture très limitée ce qui pourrait causer du stress chez les animaux avec une plus grande appétit.. L'étude des mécanismes moléculaires chez le lapin présente beaucoup de défis étant donné que le nombre d'anticorps et de tests spécifiques qui reconnaissent les séquences de lapin sont plus restreints que ceux que nous retrouvons chez les rongeurs. Par contre, le lapin est de taille plus grande. Ce qui permet une utilisation plus importante du matériel biologique dans les expériences ex-vivo en comparaison avec la quantité limitée que les rongeurs présentent. Finalement, l'effectif de lapins utilisé dans nos études est considérablement petit. Un plus grand nombre de lapins par groupe expérimental donnera une plus grande force statistique et une meilleure interprétation des résultats obtenus.

La recherche d'un médicament contre la DD doit continuer à avancer puisqu'il n'y a toujours pas de traitement efficace approuvé en clinique alors que le nombre de personnes atteints de cette maladie ne cesse d'augmenter. À notre avis, une combinaison de différentes molécules devrait être une bonne stratégie de médication contre cette pathologie complexe. En effet, l'implication de différentes voies moléculaires dans la progression de la DD laisse peu de chance à une molécule unique de corriger les multiples facteurs causant la DD. L'Entresto par exemple, est une combinaison d'un inhibiteur de la néprilysine et d'un antagoniste du récepteur à l'angiotensine (ARA) qui est en voie de validation dans l'ICFEP. Ainsi, une combinaison d'un mimétique de l'apoA-I (ayant surtout un effet anti-inflammatoire et anti-oxydant) avec un autre agent comme les IECA ou les ARAs (ayant un effet anti-hypertenseur, anti-hypertrophique, anti-fibrotique) pourrait être une bonne stratégie de traitement dans ce type de maladie. En plus, le choix du mimétique de l'apoA-I pourrait être différent d'un cas à l'autre puisque les différentes molécules de ce type de traitement ont démontré de multiples effets dans divers contextes. Par exemple, les mimétiques utilisés dans nos études (soit l'ETC-642 ou le CER-522) appartiennent à la catégorie de molécules qui activent fortement l'enzyme de la LCAT. Cependant, d'autres molécules (ayant des histidines et de cystéines par exemple) peuvent avoir des effets anti-oxydants plus importants. Également, l'hydrophobicité, la charge du mimétique et l'angle entre les hélices α peuvent avoir des effets bénéfiques sur l'affinité de ces molécules à capter les lipides ainsi qu'avoir un effet anti-inflammatoire important (exemple les mimétiques de la catégorie ELK) [256].

Bibliographie

1. Briceno, N., et al., *Ischaemic cardiomyopathy: pathophysiology, assessment and the role of revascularisation*. Heart, 2016. **102**(5): p. 397-406.
2. Gorelick, P.B., *Cerebrovascular disease. Pathophysiology and diagnosis*. Nurs Clin North Am, 1986. **21**(2): p. 275-88.
3. Zile, M.R. and J. Nappi, *Diastolic Heart Failure*. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2000. **2**(5): p. 439-450.
4. Rosen, M.R., A.L. Wit, and B.F. Hoffman, *Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. I. Cellular electrophysiology of the mammalian heart*. Am Heart J, 1974. **88**(3): p. 380-5.
5. Wit, A.L., M.R. Rosen, and B.F. Hoffman, *Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. II. Relationship of normal and abnormal electrical activity of cardiac fibers to the genesis of arrhythmias. A Automaticity*. Am Heart J, 1974. **88**(4): p. 515-24.
6. Maganti, K., et al., *Valvular heart disease: diagnosis and management*. Mayo Clin Proc, 2010. **85**(5): p. 483-500.
7. Elmariah, S. and E.R. Mohler, 3rd, *The Pathogenesis and treatment of the valvulopathy of aortic stenosis: Beyond the SEAS*. Curr Cardiol Rep, 2010. **12**(2): p. 125-32.
8. Rader, F., et al., *Left ventricular hypertrophy in valvular aortic stenosis: mechanisms and clinical implications*. Am J Med, 2015. **128**(4): p. 344-52.
9. Sika-Paotonu, D., et al., *Acute Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease*, in *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*, J.J. Ferretti, D.L. Stevens, and V.A. Fischetti, Editors. 2016: Oklahoma City (OK).
10. Baskerville, C.A., et al., *Infective endocarditis and rheumatic heart disease in the north of Australia*. Heart Lung Circ, 2012. **21**(1): p. 36-41.
11. Kaltman, A.J., J.B. Schwedel, and B. Straus, *Chronic constrictive pericarditis and rheumatic heart disease*. Am Heart J, 1953. **45**(2): p. 201-8.
12. van der Linde, D., et al., *Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(21): p. 2241-7.

13. Hauser, C.J., P. Appel, and W.C. Shoemaker, *Pathophysiologic classification of peripheral vascular disease by positional changes in regional transcutaneous oxygen tension*. Surgery, 1984. **95**(6): p. 689-93.
14. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
15. D'Agostino, R.B., Sr., et al., *General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2008. **117**(6): p. 743-53.
16. Conroy, R.M., et al., *Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project*. Eur Heart J, 2003. **24**(11): p. 987-1003.
17. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in, *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
18. Hippisley-Cox, J., et al., *Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2*. BMJ, 2008. **336**(7659): p. 1475-82.
19. Goff, D.C., Jr., et al., *2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation, 2014. **129**(25 Suppl 2): p. S49-73.
20. McClelland, R.L., et al., *10-Year Coronary Heart Disease Risk Prediction Using Coronary Artery Calcium and Traditional Risk Factors: Derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) With Validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) Study and the DHS (Dallas Heart Study)*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(15): p. 1643-53.
21. Pylypchuk, R., et al., *Cardiovascular disease risk prediction equations in 400 000 primary care patients in New Zealand: a derivation and validation study*. Lancet, 2018. **391**(10133): p. 1897-1907.
22. Omvik, P., *How smoking affects blood pressure*. Blood Press, 1996. **5**(2): p. 71-7.
23. Howard, G., et al., *Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. JAMA, 1998. **279**(2): p. 119-24.

24. Manninen, V., et al., *Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment.* Circulation, 1992. **85**(1): p. 37-45.
25. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study.* Diabetes Care, 1979. **2**(2): p. 120-6.
26. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure.* JAMA, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
27. Powers, S.K., Locke, and H.A. Demirel, *Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury.* Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(3): p. 386-92.
28. Lavie, C.J., R.V. Milani, and H.O. Ventura, *Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss.* J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(21): p. 1925-32.
29. Yudkin, J.S., et al., *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* Atherosclerosis, 2000. **148**(2): p. 209-14.
30. Austin, M.A., et al., *Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review.* Am J Epidemiol, 2004. **160**(5): p. 421-9.
31. Wakabayashi, I., *Gender differences in cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease and those with type 2 diabetes.* J Thorac Dis, 2017. **9**(5): p. E503-E506.
32. Kilgore, M., et al., *Economic burden of hospitalizations of Medicare beneficiaries with heart failure.* Risk Manag Healthc Policy, 2017. **10**: p. 63-70.
33. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic.* JAMA, 2003. **289**(2): p. 194-202.
34. Galderisi, M., *Diastolic dysfunction and diastolic heart failure: diagnostic, prognostic and therapeutic aspects.* Cardiovasc Ultrasound, 2005. **3**: p. 9.
35. Kane, G.C., et al., *Progression of left ventricular diastolic dysfunction and risk of heart failure.* JAMA, 2011. **306**(8): p. 856-63.
36. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association.* Circ Heart Fail, 2013. **6**(3): p. 606-19.

37. Gerber, Y., et al., *A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010*. JAMA Intern Med, 2015. **175**(6): p. 996-1004.
38. Masoudi, F.A., et al., *Gender, age, and heart failure with preserved left ventricular systolic function*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(2): p. 217-23.
39. Scantlebury, D.C. and B.A. Borlaug, *Why are women more likely than men to develop heart failure with preserved ejection fraction?* Curr Opin Cardiol, 2011. **26**(6): p. 562-8.
40. Pugh, P.J., T.H. Jones, and K.S. Channer, *Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure*. Eur Heart J, 2003. **24**(10): p. 909-15.
41. Basaria, S., et al., *Adverse events associated with testosterone administration*. N Engl J Med, 2010. **363**(2): p. 109-22.
42. Ben-Ari, E., et al., *Doppler-derived aortic flow measurements during and after heavy isometric exercise in healthy men versus men with myocardial infarction*. J Am Soc Echocardiogr, 1992. **5**(3): p. 219-24.
43. Pines, A., et al., *Menopause-induced changes in Doppler-derived parameters of aortic flow in healthy women*. Am J Cardiol, 1992. **69**(12): p. 1104-6.
44. Pines, A., et al., *Menopause-related changes in left ventricular function in healthy women*. Cardiology, 1992. **80**(5-6): p. 413-6.
45. Alecrin, I.N., et al., *Acute and chronic effects of oestradiol on left ventricular diastolic function in hypertensive postmenopausal women with left ventricular diastolic dysfunction*. Heart, 2004. **90**(7): p. 777-81.
46. Salpeter, S.R., et al., *Brief report: Coronary heart disease events associated with hormone therapy in younger and older women. A meta-analysis*. J Gen Intern Med, 2006. **21**(4): p. 363-6.
47. Borlaug, B.A., *The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(9): p. 507-15.
48. Gazewood, J.D. and P.L. Turner, *Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Diagnosis and Management*. Am Fam Physician, 2017. **96**(9): p. 582-588.
49. Elshazly, M.B., et al., *Impact of Atrial Fibrillation on Exercise Capacity and Mortality in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Insights From Cardiopulmonary Stress Testing*. J Am Heart Assoc, 2017. **6**(11).

50. Huis In 't Veld, A.E., et al., *How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the value of invasive stress testing*. Neth Heart J, 2016. **24**(4): p. 244-51.
51. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
52. C.M, O., *Textbook of clinical Echocardiography*. Fourth edition ed. 2009: Saunders, Elsevier.
53. Oh, J.K., et al., *Diastolic heart failure can be diagnosed by comprehensive two-dimensional and Doppler echocardiography*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(3): p. 500-6.
54. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. J Am Soc Echocardiogr, 2016. **29**(4): p. 277-314.
55. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2016. **17**(12): p. 1321-1360.
56. Mandinov, L., et al., *Diastolic heart failure*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 813-25.
57. Gaasch, W.H. and W.C. Little, *Assessment of left ventricular diastolic function and recognition of diastolic heart failure*. Circulation, 2007. **116**(6): p. 591-3.
58. Kasner, M., et al., *Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study*. Circulation, 2007. **116**(6): p. 637-47.
59. Appleton, C.P., *Influence of incremental changes in heart rate on mitral flow velocity: assessment in lightly sedated, conscious dogs*. J Am Coll Cardiol, 1991. **17**(1): p. 227-36.

60. Takatsuji, H., et al., *A new approach for evaluation of left ventricular diastolic function: spatial and temporal analysis of left ventricular filling flow propagation by color M-mode Doppler echocardiography*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(2): p. 365-71.
61. Dandel, M., et al., *Strain and strain rate imaging by echocardiography - basic concepts and clinical applicability*. Curr Cardiol Rev, 2009. **5**(2): p. 133-48.
62. Kasner, M., et al., *Global strain rate imaging for the estimation of diastolic function in HFNEF compared with pressure-volume loop analysis*. Eur J Echocardiogr, 2010. **11**(9): p. 743-51.
63. Nakai, H., et al., *Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration*. Eur J Echocardiogr, 2009. **10**(8): p. 926-32.
64. Perry, R., et al., *Assessment of early diastolic left ventricular function by two-dimensional echocardiographic speckle tracking*. Eur J Echocardiogr, 2008. **9**(6): p. 791-5.
65. Maisel, A.S., et al., *Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(11): p. 2010-7.
66. van Veldhuisen, D.J., et al., *B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(14): p. 1498-506.
67. Borlaug, B.A., et al., *Exercise hemodynamics enhance diagnosis of early heart failure with preserved ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2010. **3**(5): p. 588-95.
68. Fukuta, H. and W.C. Little, *The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling*. Heart Fail Clin, 2008. **4**(1): p. 1-11.
69. Abraham, J. and T.P. Abraham, *The role of echocardiography in hemodynamic assessment in heart failure*. Heart Fail Clin, 2009. **5**(2): p. 191-208.
70. Nachar, W., et al., *Optimisation of reference genes for gene-expression analysis in a rabbit model of left ventricular diastolic dysfunction*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89331.
71. Anthony Fauci, E.B., Denis Kasper, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Jameson, Joseph Loscalzo, *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 17th edition ed.: McGraw-Hill Professional.

72. Olson, T.P., B.D. Johnson, and B.A. Borlaug, *Impaired Pulmonary Diffusion in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. JACC Heart Fail, 2016. **4**(6): p. 490-8.
73. Shah, A.M., *Ventricular remodeling in heart failure with preserved ejection fraction*. Curr Heart Fail Rep, 2013. **10**(4): p. 341-9.
74. Borbely, A., et al., *Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure*. Circulation, 2005. **111**(6): p. 774-81.
75. van Heerebeek, L., et al., *Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure*. Circulation, 2006. **113**(16): p. 1966-73.
76. Mohammed, S.F. and M.M. Redfield, *Response to Letters Regarding Article, "Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction"*. Circulation, 2015. **132**(16): p. e206.
77. Vasan, R.S., et al., *Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(7): p. 1948-55.
78. Satpathy, C., et al., *Diagnosis and management of diastolic dysfunction and heart failure*. Am Fam Physician, 2006. **73**(5): p. 841-6.
79. Periasamy, M. and P.M. Janssen, *Molecular basis of diastolic dysfunction*. Heart Fail Clin, 2008. **4**(1): p. 13-21.
80. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment*. Circulation, 2002. **105**(12): p. 1503-8.
81. Dekleva, M., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction is related to oxidative stress and exercise capacity in hypertensive patients with preserved systolic function*. Cardiology, 2007. **108**(1): p. 62-70.
82. Kai, H., et al., *Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis*. Hypertens Res, 2005. **28**(6): p. 483-90.
83. Loffredo, F.S., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium*. Circ Res, 2014. **115**(1): p. 97-107.
84. Fabiato, A., *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol, 1983. **245**(1): p. C1-14.

85. Luss, I., et al., *Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium v ventricle in different species*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(6): p. 1299-314.
86. Minajeva, A., et al., *Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. H2498-507.
87. Huang, Y., et al., *Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 97-102.
88. Frank, K.F., et al., *Modulation of SERCA: implications for the failing human heart*. Basic Res Cardiol, 2002. **97 Suppl 1**: p. I72-8.
89. Simmerman, H.K. and L.R. Jones, *Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function*. Physiol Rev, 1998. **78**(4): p. 921-47.
90. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 566-77.
91. del Monte, F., et al., *Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 904-7.
92. Miyamoto, M.I., et al., *Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 793-8.
93. Hinata, M., et al., *Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes*. J Physiol, 2002. **545**(Pt 2): p. 453-61.
94. DiPolo, R. and L. Beauge, *Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 155-203.
95. Hasenfuss, G., et al., *Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium*. Circulation, 1999. **99**(5): p. 641-8.
96. Louch, W.E., et al., *Sodium accumulation promotes diastolic dysfunction in end-stage heart failure following Serca2 knockout*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 3): p. 465-78.
97. Mosterd, A., et al., *Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989*. N Engl J Med, 1999. **340**(16): p. 1221-7.
98. Zaman, M.A., S. Oparil, and D.A. Calhoun, *Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(8): p. 621-36.

99. Brilla, C.G., *Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(1): p. 1-3.
100. Brilla, C.G., *Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure*. Herz, 2000. **25**(3): p. 299-306.
101. Orsborne, C., et al., *The renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: the past, the present and the future*. Postgrad Med J, 2017. **93**(1095): p. 29-37.
102. Chen, H.H. and J.C. Burnett, *Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure*. Curr Cardiol Rep, 2000. **2**(3): p. 198-205.
103. Chen, H.H. and J.C. Burnett, Jr., *The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 406-16.
104. Cauliez, B., M.C. Berthe, and A. Lavoigne, *[Brain natriuretic peptide: physiological, biological and clinical aspects]*. Ann Biol Clin (Paris), 2005. **63**(1): p. 15-25.
105. Zivin, R.A., et al., *Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(20): p. 6325-9.
106. Sudoh, T., et al., *A new natriuretic peptide in porcine brain*. Nature, 1988. **332**(6159): p. 78-81.
107. Potter, L.R., et al., *Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 341-66.
108. Potter, L.R., *Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation*. FEBS J, 2011. **278**(11): p. 1808-17.
109. Levin, E.R., D.G. Gardner, and W.K. Samson, *Natriuretic peptides*. N Engl J Med, 1998. **339**(5): p. 321-8.
110. Lubien, E., *Utility of B-Natriuretic Peptide in Detecting Diastolic Dysfunction: Comparison With Doppler Velocity Recordings*. Circulation, 2002. **105**(5): p. 595-601.
111. Haugen, E., et al., *Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats*. Int J Cardiol, 2007. **115**(1): p. 24-8.
112. Luchner, A., et al., *Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(3): p. 601-7.

113. Singal, P.K., et al., *The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(3): p. 426-32.
114. Murase, T., et al., *Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome*. Hypertens Res, 2012. **35**(2): p. 186-93.
115. Horgan, S.J., et al., *Serum Amyloid P-Component Prevents Cardiac Remodeling in Hypertensive Heart Disease*. J Cardiovasc Transl Res, 2015. **8**(9): p. 554-66.
116. Ma, L., et al., *Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the transgenic (mRen2) rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(11): p. H2341-51.
117. Landmesser, U., et al., *Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3073-8.
118. Lee, J.H., et al., *Stenotic aortic valves have dysfunctional mechanisms of anti-inflammation: implications for aortic stenosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **141**(2): p. 481-6.
119. Bagnost, T., et al., *Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 569-77.
120. Tousoulis, D., et al., *Increased plasma adhesion molecule levels in patients with heart failure who have ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy*. Am Heart J, 2001. **141**(2): p. 277-80.
121. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
122. Hulsmans, M., et al., *Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction*. J Exp Med, 2018. **215**(2): p. 423-440.
123. Karagoz, A., et al., *The role of neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor of diastolic dysfunction in hypertensive patients*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(3): p. 433-40.
124. Vulesevic, B., et al., *Subclinical Inflammation in Heart Failure: A Neutrophil Perspective*. Can J Cardiol, 2018. **34**(6): p. 717-725.

125. Van Tassell, B.W., et al., *Interleukin-1 blockade in heart failure with preserved ejection fraction: rationale and design of the Diastolic Heart Failure Anakinra Response Trial 2 (D-HART2)*. Clin Cardiol, 2017. **40**(9): p. 626-632.
126. Chancey, A.L., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Cardiac mast cell-mediated activation of gelatinase and alteration of ventricular diastolic function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2152-8.
127. Wang, H., et al., *Mast Cell Inhibition Attenuates Cardiac Remodeling and Diastolic Dysfunction in Middle-aged, Ovariectomized Fischer 344 x Brown Norway Rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2016. **68**(1): p. 49-57.
128. Matsumoto, T., et al., *Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure*. Circulation, 2003. **107**(20): p. 2555-8.
129. Hwang, S.J., V. Melenovsky, and B.A. Borlaug, *Implications of coronary artery disease in heart failure with preserved ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(25 Pt A): p. 2817-27.
130. Tian, R., et al., *Role of MgADP in the development of diastolic dysfunction in the intact beating rat heart*. J Clin Invest, 1997. **99**(4): p. 745-51.
131. Steine, K., M. Stugaard, and O.A. Smiseth, *Mechanisms of retarded apical filling in acute ischemic left ventricular failure*. Circulation, 1999. **99**(15): p. 2048-54.
132. Eberli, F.R., et al., *Lack of direct role for calcium in ischemic diastolic dysfunction in isolated hearts*. Circulation, 2000. **102**(21): p. 2643-9.
133. Hoffmann, S., et al., *Tissue Doppler echocardiography reveals distinct patterns of impaired myocardial velocities in different degrees of coronary artery disease*. Eur J Echocardiogr, 2010. **11**(6): p. 544-9.
134. Stohr, E.J., H. Takayama, and G. Ferrari, *Stretch your heart-but not too far: The role of titin mutations in dilated cardiomyopathy*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018. **156**(1): p. 209-214.
135. Cazorla, O., et al., *Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness*. Circ Res, 2000. **86**(1): p. 59-67.
136. Fukuda, N., et al., *Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner*. J Gen Physiol, 2005. **125**(3): p. 257-71.

137. Nagueh, S.F., et al., *Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 155-62.
138. Kruger, M. and W.A. Linke, *Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension*. J Muscle Res Cell Motil, 2006. **27**(5-7): p. 435-44.
139. Kruger, M., et al., *Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs*. Circ Res, 2009. **104**(1): p. 87-94.
140. Hidalgo, C., et al., *PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness*. Circ Res, 2009. **105**(7): p. 631-8, 17 p following 638.
141. Bull, M., et al., *Alternative Splicing of Titin Restores Diastolic Function in an HFpEF-Like Genetic Murine Model (TtnDeltaIAjxn)*. Circ Res, 2016. **119**(6): p. 764-72.
142. Schwartzberg, S., et al., *Effects of vasodilation in heart failure with preserved or reduced ejection fraction implications of distinct pathophysiologies on response to therapy*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(5): p. 442-51.
143. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(16): p. e147-239.
144. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
145. Kiel, R.G. and P. Deedwania, *Medical treatment of hypertension in patients with heart failure with preserved ejection fraction*. Curr Cardiol Rep, 2013. **15**(12): p. 428.
146. Huang, D. and J.W. Cheng, *Pharmacologic management of heart failure with preserved ejection fraction*. Ann Pharmacother, 2010. **44**(12): p. 1933-45.
147. Regan, J.A., et al., *A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **309**(5): p. H771-8.

148. Hunt, S.A., et al., *ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society*. Circulation, 2005. **112**(12): p. e154-235.
149. Barreras, A. and C. Gurk-Turner, *Angiotensin II receptor blockers*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2003. **16**(1): p. 123-6.
150. McCarthy, C.A., et al., *Update on the angiotensin AT(2) receptor*. Curr Hypertens Rep, 2013. **15**(1): p. 25-30.
151. Arai, K. and G.P. Chrousos, *Aldosterone Deficiency and Resistance*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
152. Edelmann, F., et al., *Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the Aldo-DHF randomized controlled trial*. JAMA, 2013. **309**(8): p. 781-91.
153. Pitt, B., et al., *Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2014. **370**(15): p. 1383-92.
154. Basaraba, J.E. and A.R. Barry, *Pharmacotherapy of heart failure with preserved ejection fraction*. Pharmacotherapy, 2015. **35**(4): p. 351-60.
155. Faris, R., et al., *Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials*. Int J Cardiol, 2002. **82**(2): p. 149-58.
156. Solomon, S.D., et al., *Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Rationale and Design of the PARAGON-HF Trial*. JACC Heart Fail, 2017. **5**(7): p. 471-482.
157. McMurray, J.J., et al., *Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure*. N Engl J Med, 2014. **371**(11): p. 993-1004.
158. Yamamoto, K., et al., *Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction: the Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF)*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(1): p. 110-8.

159. Bergstrom, A., et al., *Effect of carvedilol on diastolic function in patients with diastolic heart failure and preserved systolic function. Results of the Swedish Doppler-echocardiographic study (SWEDIC)*. Eur J Heart Fail, 2004. **6**(4): p. 453-61.
160. Nodari, S., M. Metra, and L. Dei Cas, *Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol*. Eur J Heart Fail, 2003. **5**(5): p. 621-7.
161. Takeda, Y., et al., *Effects of carvedilol on plasma B-type natriuretic peptide concentration and symptoms in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. Am J Cardiol, 2004. **94**(4): p. 448-53.
162. Zhou, X., et al., *Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 880-8.
163. Coats, A. and S. Jain, *Protective effects of nebivolol from oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage*. J Hum Hypertens, 2017. **31**(6): p. 376-381.
164. Sulfi, S. and A.D. Timmis, *Ivabradine -- the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina*. Int J Clin Pract, 2006. **60**(2): p. 222-8.
165. Cohn, J.N., *Treatment of patients with heart failure*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1440-1.
166. Tardif, J.C., *Clinical results of I(f) current inhibition by ivabradine*. Drugs, 2007. **67 Suppl 2**: p. 35-41.
167. Swedberg, K., et al., *Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study*. Lancet, 2010. **376**(9744): p. 875-85.
168. Busseuil, D., et al., *Heart rate reduction by ivabradine reduces diastolic dysfunction and cardiac fibrosis*. Cardiology, 2010. **117**(3): p. 234-42.
169. Pal, N., et al., *Effect of Selective Heart Rate Slowing in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. Circulation, 2015. **132**(18): p. 1719-25.
170. Komajda, M., et al., *Effect of ivabradine in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the EDIFY randomized placebo-controlled trial*. Eur J Heart Fail, 2017. **19**(11): p. 1495-1503.
171. Kavalipati, N., et al., *Pleiotropic effects of statins*. Indian J Endocrinol Metab, 2015. **19**(5): p. 554-62.

172. Liao, J.K. and U. Laufs, *Pleiotropic effects of statins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 89-118.
173. Fukuta, H., et al., *Statin therapy may be associated with lower mortality in patients with diastolic heart failure: a preliminary report*. Circulation, 2005. **112**(3): p. 357-63.
174. Fukuta, H., et al., *The effect of statins on mortality in heart failure with preserved ejection fraction: a meta-analysis of propensity score analyses*. Int J Cardiol, 2016. **214**: p. 301-6.
175. Merlet, N., et al., *HDL mimetic peptide CER-522 treatment regresses left ventricular diastolic dysfunction in cholesterol-fed rabbits*. Int J Cardiol, 2016. **215**: p. 364-371.
176. Gordts, S.C., et al., *Beneficial effects of selective HDL-raising gene transfer on survival, cardiac remodelling and cardiac function after myocardial infarction in mice*. Gene Ther, 2013. **20**(11): p. 1053-61.
177. Borthwick, F., et al., *ApoA-I infusion reduces arterial cholesterol and myocardial lesions in a rat model of cardiac dysfunction and insulin resistance*. Atherosclerosis, 2012. **222**(2): p. 402-8.
178. Kontush, A.C., M.J., *High-density lipoproteins: structure, metabolism, function and therapeutics*. Wiley New York. 2012.
179. Asztalos, B.F. and E.J. Schaefer, *High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions*. Am J Cardiol, 2003. **91**(7A): p. 12E-17E.
180. Brewer, H.B., Jr., et al., *Amino acid sequence of human apoLp-Gln-II (apoA-II), an apolipoprotein isolated from the high-density lipoprotein complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(5): p. 1304-8.
181. *High density lipoproteins: from biological understanding to clinical exploitation*. Handbook of experimental pharmacology. Vol. 224. 2015: Springer.
182. Holmquist, L., *Selective extraction of lecithin:cholesterol acyltransferase (EC 2.3.1.43) from human plasma*. J Biochem Biophys Methods, 2002. **52**(1): p. 63-8.
183. Goswami, B., et al., *Paraoxonase: a multifaceted biomolecule*. Clin Chim Acta, 2009. **410**(1-2): p. 1-12.
184. Mallat, Z., G. Lambeau, and A. Tedgui, *Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A(2) in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers*. Circulation, 2010. **122**(21): p. 2183-200.

185. Chen, N., et al., *Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides*. J Lab Clin Med, 2000. **136**(1): p. 58-65.
186. Qiu, X., et al., *Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(2): p. 106-13.
187. Barter, P.J. and K.A. Rye, *Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 1755-66.
188. Cabana, V.G., et al., *HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease*. J Lipid Res, 1996. **37**(12): p. 2662-74.
189. Vaisar, T., et al., *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 746-56.
190. L'homme, M.e.a., *Lipidomics in lipoprotein biology*. Lipidomics: technologies and applications. 2012: Wiley.
191. Rye, K.A., et al., *The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S195-200.
192. Tabet, F. and K.A. Rye, *High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(2): p. 87-98.
193. Harrington, J.R., *The role of MCP-1 in atherosclerosis*. Stem Cells, 2000. **18**(1): p. 65-6.
194. Newby, A.C., *Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture*. Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 1-31.
195. Libby, P., *Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art*. Am J Cardiol, 2003. **91**(3A): p. 3A-6A.
196. Osei-Hwedieh, D.O., et al., *Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents*. Pharmacol Ther, 2011. **130**(1): p. 83-91.
197. Ossoli, A., et al., *Role of LCAT in Atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2016. **23**(2): p. 119-27.
198. Rohrl, C. and H. Stangl, *HDL endocytosis and resecretion*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(11): p. 1626-33.

199. Goffinet, M., et al., *P2Y₁₃ receptor regulates HDL metabolism and atherosclerosis in vivo*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95807.
200. Camont, L., et al., *Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(12): p. 2715-23.
201. Zerrad-Saadi, A., et al., *HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(12): p. 2169-75.
202. Cockerill, G.W., et al., *High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 1987-94.
203. Calabresi, L., et al., *Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(1): p. 61-5.
204. Xia, P., et al., *High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33143-7.
205. Massamiri, T., P.S. Tobias, and L.K. Curtiss, *Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I*. J Lipid Res, 1997. **38**(3): p. 516-25.
206. Nicholls, S.J., et al., *Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits*. Circulation, 2005. **111**(12): p. 1543-50.
207. Navab, M., et al., *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1*. J Lipid Res, 2000. **41**(9): p. 1481-94.
208. Kopprasch, S., J. Pietzsch, and J. Graessler, *The protective effects of HDL and its constituents against neutrophil respiratory burst activation by hypochlorite-oxidized LDL*. Mol Cell Biochem, 2004. **258**(1-2): p. 121-7.

209. Kopprasch, S., et al., *The pivotal role of scavenger receptor CD36 and phagocyte-derived oxidants in oxidized low density lipoprotein-induced adhesion to endothelial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(3): p. 460-71.
210. Liao, X.L., et al., *Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A-I*. Life Sci, 2005. **77**(3): p. 325-35.
211. Klimov, A.N., et al., *Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo*. Atherosclerosis, 1993. **100**(1): p. 13-8.
212. Couillard, C., et al., *Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(7): p. 1226-32.
213. Maeda, K., Y. Noguchi, and T. Fukui, *The effects of cessation from cigarette smoking on the lipid and lipoprotein profiles: a meta-analysis*. Prev Med, 2003. **37**(4): p. 283-90.
214. Calabresi, L., et al., *An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia*. Metabolism, 2004. **53**(2): p. 153-8.
215. Gordts, S.C., et al., *Lipid Lowering and HDL Raising Gene Transfer Increase Endothelial Progenitor Cells, Enhance Myocardial Vascularity, and Improve Diastolic Function*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46849.
216. McCormack, P.L. and G.M. Keating, *Prolonged-release nicotinic acid: a review of its use in the treatment of dyslipidaemia*. Drugs, 2005. **65**(18): p. 2719-40.
217. Lavigne, P.M. and R.H. Karas, *The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(4): p. 440-6.
218. Otvos, J.D., et al., *Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial*. Circulation, 2006. **113**(12): p. 1556-63.

219. Keech, A., et al., *Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial*. Lancet, 2005. **366**(9500): p. 1849-61.
220. Jakob, T., et al., *Fibrates for primary prevention of cardiovascular disease events*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **11**: p. CD009753.
221. Deedwania, P.C., et al., *Effects of rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin, and pravastatin on atherogenic dyslipidemia in patients with characteristics of the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 2005. **95**(3): p. 360-6.
222. Barter, P.J., et al., *Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events*. N Engl J Med, 2007. **357**(21): p. 2109-22.
223. Schwartz, G.G., et al., *Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome*. N Engl J Med, 2012. **367**(22): p. 2089-99.
224. Tardif, J.C., et al., *Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib*. Circ Cardiovasc Genet, 2015. **8**(2): p. 372-82.
225. Lincoff, A.M., et al., *Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease*. N Engl J Med, 2017. **376**(20): p. 1933-1942.
226. Group, H.T.R.C., et al., *Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(13): p. 1217-1227.
227. Sethi, A.A., et al., *Apolipoprotein AI mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis*. Curr Opin Investig Drugs, 2007. **8**(3): p. 201-12.
228. Navab, M., et al., *Structure and function of HDL mimetics*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 164-8.
229. Navab, M., et al., *Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 290-2.
230. Di Bartolo, B.A., et al., *The apolipoprotein A-I mimetic peptide, ETC-642, reduces chronic vascular inflammation in the rabbit*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 224.
231. Busseuil, D., et al., *Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(4): p. 765-73.

232. Miao, D.M., et al., *Influence of low high-density lipoprotein cholesterol on arterial stiffening and left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2011. **13**(10): p. 710-5.
233. Horio, T., et al., *Influence of low high-density lipoprotein cholesterol on left ventricular hypertrophy and diastolic function in essential hypertension*. Am J Hypertens, 2003. **16**(11 Pt 1): p. 938-44.
234. Reed, A.L., et al., *Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H824-31.
235. Douglas, P.S. and B. Tallant, *Hypertrophy, fibrosis and diastolic dysfunction in early canine experimental hypertension*. J Am Coll Cardiol, 1991. **17**(2): p. 530-6.
236. Horgan, S., et al., *Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction*. J Card Fail, 2014. **20**(12): p. 984-95.
237. Gan, L.M., et al., *Amplitude and velocity of mitral annulus motion in rabbits*. Echocardiography, 2004. **21**(4): p. 313-7.
238. Mueller, C., et al., *The integration of BNP and NT-proBNP into clinical medicine*. Swiss Med Wkly, 2007. **137**(1-2): p. 4-12.
239. Toda, T., D.E. Leszczynski, and F.A. Kummerow, *The role of 25-hydroxy-vitamin D3 in the induction of atherosclerosis in swine and rabbit by hypervitaminosis D*. Acta Pathol Jpn, 1983. **33**(1): p. 37-44.
240. Toda, T., Y. Toda, and F.A. Kummerow, *Coronary arterial lesions in piglets from sows fed moderate excesses of vitamin D*. Tohoku J Exp Med, 1985. **145**(3): p. 303-10.
241. Schmidt, N., et al., *Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35316.
242. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
243. Westermann, D., et al., *Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 44-52.

244. Sartori, M., et al., *Association between Diastolic Dysfunction with Inflammation and Oxidative Stress in Females ob/ob Mice*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 572.
245. Lee, J.K., et al., *Differential association of proinflammatory cytokines with left ventricular diastolic dysfunction in subjects with and without continuous ambulatory peritoneal dialysis*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(11): p. 974-80.
246. Wu, C.K., et al., *Dissecting the mechanisms of left ventricular diastolic dysfunction and inflammation in peritoneal dialysis patients*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62722.
247. Finkel, M.S., et al., *Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide*. Science, 1992. **257**(5068): p. 387-9.
248. Hirota, H., et al., *Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4862-6.
249. Tabet, F., et al., *Lipid-free apolipoprotein A-I and discoidal reconstituted high-density lipoproteins differentially inhibit glucose-induced oxidative stress in human macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 1192-200.
250. Ou, Z., et al., *L-4F, an apolipoprotein A-I mimetic, restores nitric oxide and superoxide anion balance in low-density lipoprotein-treated endothelial cells*. Circulation, 2003. **107**(11): p. 1520-4.
251. Tani, S., et al., *Contribution of apolipoprotein A-I to the reduction in high-sensitivity C-reactive protein levels by different statins: comparative study of pitavastatin and atorvastatin*. Heart Vessels, 2015. **30**(6): p. 762-70.
252. Sirnio, P., et al., *Decreased serum apolipoprotein A1 levels are associated with poor survival and systemic inflammatory response in colorectal cancer*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 5374.
253. Jetten, N., et al., *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. Angiogenesis, 2014. **17**(1): p. 109-18.
254. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
255. Hattori, T., et al., *Characterization of a new animal model of metabolic syndrome: the DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rat*. Nutr Diabetes, 2011. **1**: p. e1.

256. Baker, P.W., et al., *Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression*. J Lipid Res, 2000. **41**(8): p. 1261-7.
257. D'Souza, W., et al., *Structure/function relationships of apolipoprotein a-I mimetic peptides: implications for antiatherogenic activities of high-density lipoprotein*. Circ Res, 2010. **107**(2): p. 217-27.
258. Niyonzima, N., et al., *Reconstituted High-Density Lipoprotein Attenuates Cholesterol Crystal-Induced Inflammatory Responses by Reducing Complement Activation*. J Immunol, 2015. **195**(1): p. 257-64.
259. Thacker, S.G., et al., *High-density lipoprotein reduces inflammation from cholesterol crystals by inhibiting inflammasome activation*. Immunology, 2016. **149**(3): p. 306-319.
260. Gerster, R., et al., *Anti-inflammatory Function of High-Density Lipoproteins via Autophagy of IkappaB Kinase*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015. **1**(2): p. 171-187 e1.
261. Wen, S.Y., et al., *Protective effect of HDL on NADPH oxidase-derived super oxide anion mediates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179492.
262. Tang, J., et al., *Influence of route of administration and lipidation of apolipoprotein A-I peptide on pharmacokinetics and cholesterol mobilization*. J Lipid Res, 2017. **58**(1): p. 124-136.

Annexe I: Diastolic dysfunction: assessment, mechanisms and experimental models.

Walid Nachar ^{a,b}, Éric Rhéaume ^{a,b} and Jean-Claude Tardif ^{a,b}.

^aMontreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, H1T 1C8, Canada

^bUniversité de Montréal, 2900 Edouard Montpetit Street, Montreal, H3T 1J4, Canada

Corresponding author:

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Contribution de l'étudiant au Manuscrit #3

L'article qui suit comprend une revue générale de la littérature concernant les principes de bases à savoir sur la DD ainsi que les modèles animaux les plus utilisés dans les études de cette pathologie. Le premier auteur a fait la revue de la littérature et a écrit le manuscrit. Les coauteurs ont principalement contribué à la révision du manuscrit ainsi que par le partage de leurs connaissances.

Abstract

Diastolic dysfunction (DD), also called diastolic heart failure (DHF) or heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), is one of the most important cardiac disease if considering its impact on patient's number of hospitalisation when its symptoms appear. Generally, DD refers to decrease of myocardial performance due to its stiffness or linked to its relaxation properties. Lack of approved treatment for DD is mostly due to the incomplete understanding of its underlying mechanisms. In contrast to atherosclerosis or other cardiac diseases, the number of animal models for DD is limited. Also, the majority of these existent models are not necessarily suitable for the study of the molecular mechanisms involved in the progression of DD.

The aim of this review is to summarize the available DD experimental models, their advantages and weaknesses. We will also describe the methods of assessment of DD and the different potent molecular mechanisms underlying this pathology.

Introduction

Heart failure (HF) is a common condition, usually progressive, with unfortunately poor prognosis [1], causing more than one million hospitalisation per year in North America [2]. When systolic function is altered, the myocardial active mechanism for pumping the blood occurs in a suboptimal way. This result in amount of ejected blood that is insufficient to meet the metabolic requirements of the body, or that is only met with high filling pressures [3, 4]. Thus, HF usually settles insidiously by the accumulation of harmful effects of chronically elevated afterload or of myocardial injury. There are two distinguished types: HF with reduced ejection fraction (HFrEF) also called systolic heart failure (SHF) characterised by a left ventricle ejection fraction (LVEF) less than 50% and referred to systolic dysfunction (SD). The other form of HF is called HF with preserved ejection fraction (HFpEF) or diastolic heart failure (DHF) characterised by a LVEF higher than 50% and referred to diastolic dysfunction (DD) [5]. DD may occur alone without presence of SD, however the two forms can be retrieved simultaneously. Only DD will be discussed in this review.

The main difference between DD and HFpEF referred basically to the presence of clinical symptoms in DHF. These symptoms and signs can be summarised as dyspnea (at rest and/or with exercise), higher jugular venous pressure (pressure overload), and pulmonary and lower extremity oedema [5, 6]. Two fundamental processes regulate the diastolic function of the left ventricle (LV). The first is the ability of LV to contract, determined by the passive elastic properties of the myocardial fibres. The second is LV's ability to relax by an active process, adenosine triphosphate (ATP) dependent [7].

In normal physiology, during diastole, suitable LV relaxation creates a difference of pressure between LV and the left atrium (LA). This facilitates the early passive LV filling. Once the pressure between the two chambers becomes equal, LA contracts to provide to the LV an additional volume of 20-25% of the total filled volume. This is known as the active filling phase [8]. However, in a pathological context of DD, LV wall thickness is increased. Cardiomyocytes are enlarged and the extracellular matrix becomes stiffer with higher proportion of collagen fibres [9]. Unlike HFrEF, which is more characterized by an eccentric LV remodelling (dilated cardiomyopathy), the overall picture of the HFpEF frequently looks like a concentric hypertrophy model characterized by increased thickness of the LV wall and narrower LV inner dimension (except in hemochromatosis for example) [10]. Also, the HFpEF patients have a delayed cardiomyocyte relaxation time, abnormal total volume of LV filling and a time lag of early diastolic phase to the late diastolic phase. This explains, at least in part, the higher intolerance to arrhythmias or tachycardia, which further reduces or affects the diastolic filling time, in patients suffering from HFpEF.

Several different pathologies can affect diastolic myocardial function. Indeed, significant LV hypertrophy, fibrosis, constrictive pericarditis [11], aortic valve stenosis or overload diseases such as amyloid deposition or hemochromatosis (in this case SD is also affected) can cause DD [4, 7, 12]. To our knowledge, there is no proven treatment targeting DD directly. Actual strategies are limited to treat the underlying causes of the DD. The purpose of this review is to give a global view on the importance of DD and to put the emphasis on the urgent need for suitable animal models to use in DD treatment-targeting studies.

LVDD assessment by imaging techniques

1. Echocardiography

Imaging plays an important role in medical practice and particularly in the assessment of the DD [13-15]. Echocardiography in two dimensions (2D), using ultrasound in real-time, is utilized to view several parameters such as the myocardium structure, the four chambers, valves, pericardium and aorta. In addition, using the Doppler component, it is possible to determine the velocity of blood flow [16, 17] as well as heart muscle contractility parameters. Among its advantages is that the procedure is non-invasive and non-expensive. This technique can be used directly at the chest wall (transthoracic echocardiography - TTE) or by transesophageal route (ETO) [13]. We'll provide an overview of applications of echocardiography in DD.

First of all, this echocardiography is good for measuring the volume, function and the structure of the left ventricle (LV). In this case, it is useful for the diagnosis of LV hypertrophy and hypertrophic cardiomyopathy. It is also suitable to image the other heart chambers and estimate their volume.

Moreover, echocardiography is the ‘‘gold standard’’ to visualize the morphology and movement of the valves. Valve stenosis is diagnosed by a thickened valve, a decrease in its mobility and by a narrowed valve opening area [17]. Pressure gradient between the atrium and the ventricle during diastole can be calculated via the transmitral velocity curve. These values depends on the rate of ventricular relaxation, the resistance of the mitral valve and ventricular compliance [18]. Thus, progression of the DD can be assessed by Doppler curves.

Classification of the severity or stage of the DD is possible by using several echocardiographic parameters [19]. These are divided to three main categories: measurements of transmitral blood flow, tissue measurements at mitral valve level and those of the pulmonary veins flow [17, 19] (Figure 1).

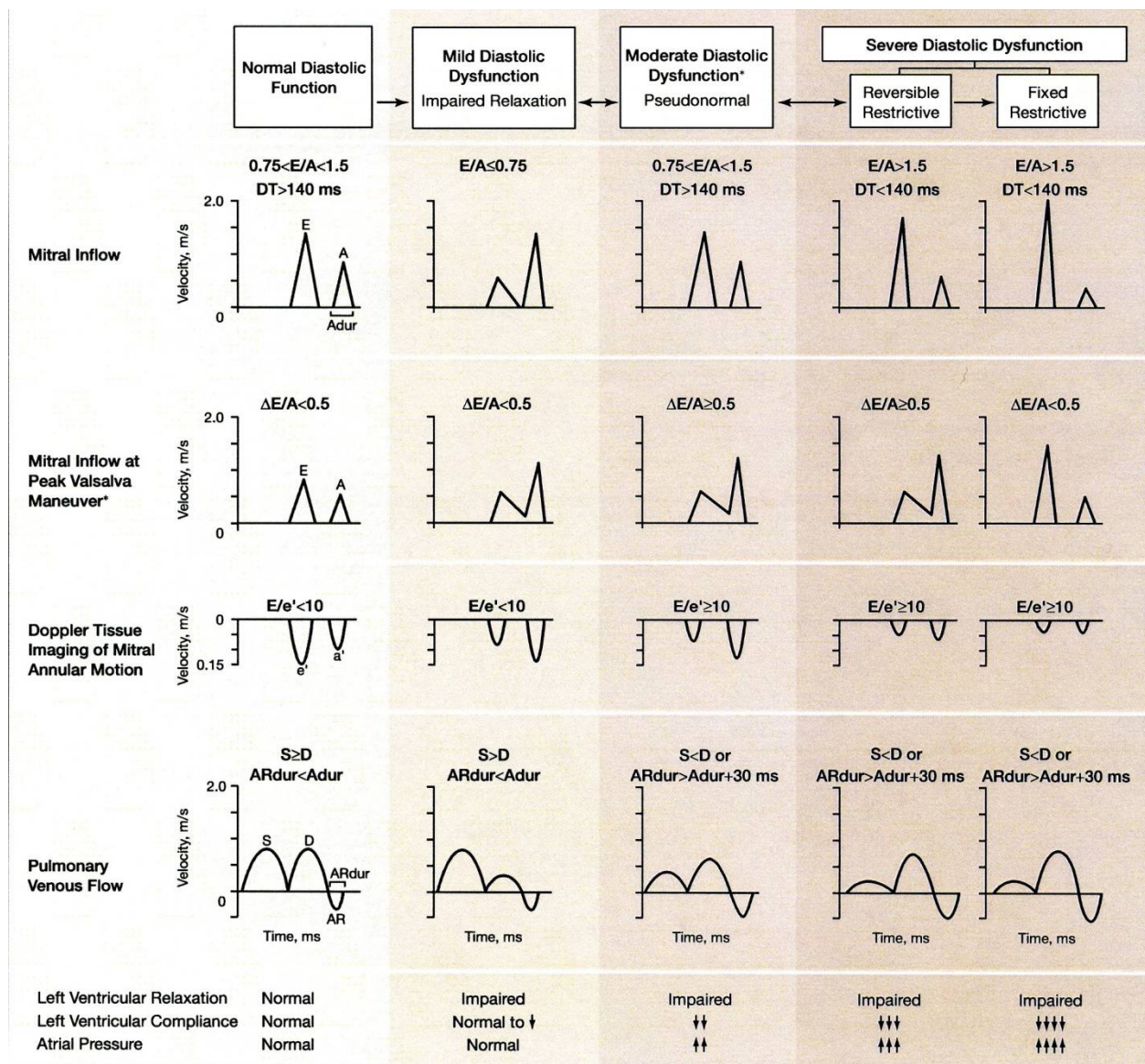


Figure 1: Echocardiographic parameters of DD. Extracted from [19].

2. Catheterization:

Beside echocardiography for the assessment of DD, invasive cardiac catheterization can provide a lot of information and is essential in many cases.

Measurements through these catheters allow to assess the changes during systole and diastole of LV parameters related to pressure and blood volume. We cite among these parameters: the maximal (P max) and minimal pressure (P min), LV end-diastolic pressure (LVEDP) and the time derivative of the positive and negative differential pressure (dP/dt and $-dP/dt$, respectively). Moreover, it is also interesting to measure the stroke volume (SV), diastolic volume (LVEDV) and their ratio: the ejection fraction ($EF = SV / LVEDV$). In HFpEF patients, increased LVEDP and pulmonary arterial wedge pressure (PAWP) can be retrieved. A pressure-volume curve (P/V) is then used to test the performance of the LV [3]. Preload, afterload and LV contractility can also be measured using this P/V curve. Decrease in ventricular compliance results in an increase of the slope of the ventricular end-diastolic pressure-volume relationship (the plot shifts up and to the left of the P/V curve). However, stroke volume is decreasing when ventricular filling volume (preload) decreased in restrictive DD stage. Also, time constant for the isovolumic-pressure decline (τ) is usually prolonged in HFpEF patients [20].

Several studies on DD have shown significant correlations between the hemodynamic and echocardiographic measurements [14, 15]. Indeed, an increase of E/E' ratio measured by echocardiography has been positively correlated with diastolic pressure of the LV (LVEDP) measured by catheter [15]. Moreover, a study performed by our team in hypercholesterolemic rabbits (manuscript in preparation) also demonstrated good correlations between echocardiographic and hemodynamic measurements.

The biggest limitation of hemodynamic measurements by catheterization is that this technique requires an invasive access. Moreover, unlike echocardiography, these measures cannot be repeated in a short-term study. This aspect is limiting especially when following the disease progression over time. Such monitoring is an aspect that researchers often use in experimental studies and particularly when trying to assess drugs' effects over time.

Mechanisms involved in the development of DD:

Several factors may contribute to the decrease of ventricular compliance and its incapacity to relax quickly and normally during diastole. Clinically, cardiac ischemia and ventricular hypertrophy are the most common causes of DD [21, 22]. Disorders in neurohormonal system (renin-angiotensin-aldosterone, natriuretic peptides [7], calcium homeostasis [23], fibrosis [24], oxidative stress [25] and inflammation [26] are the principal known mechanisms altered in DD onset.

1. Renin-Angiotensin-Aldosterone (RAA)

Hypertension is a leading cause of ventricular hypertrophy and heart failure. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) has largely been described in studies of hypertension and cardiovascular disease in general [27]. Renin is a protease synthesized in juxta-glomerular kidney cells. It cleaves angiotensinogen, which is essentially synthesized in the liver, to yield angiotensin I, which is an inactive form [28]. Angiotensin I is then converted by angiotensin converting enzymes (ACE) or chymase to its active form, angiotensin II (Ang II). The latter is a peptide which increases blood pressure by acting on the sensation of thirst (leading to larger water supply) and the secretion of aldosterone. However, in vessels, Ang II induces contraction of smooth muscle cells leading to vasoconstriction and increasing blood pressure [28]. Other functions have also

been assigned to this peptide, such as increasing stiffness of the cardiac tissue by increasing fibrosis [29, 30]. Moreover, it can increase activity of the sympathetic nervous system, secretion of NADP and NADPH activity (which increases oxidative stress and causes organs' damage) [31, 32] and an increase of leukocytes' adhesion to inflammatory sites [28]. The effects of Ang II essentially occur by its binding to its own type I receptor (AT1). Finally, secretion of aldosterone may lead to hydro-sodium retention, which increases blood volume and triggers hypertension. An important therapeutic value is conferred to studies of molecules like renin inhibitors, ACE inhibitors, angiotensin receptor antagonist (ARA) and aldosterone antagonist. These treatments show improvement in heart function in different studies of HFpEF and may be of high impact in the development of future drugs against HFpEF [28].

2. Natriuretic peptides

Natriuretic peptides are very important in the context of DD [33, 34]. Indeed, the natriuretic family consists of three types of structurally similar peptides: atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide or type B (BNP) and natriuretic peptide type C (CNP) [35, 36]. In humans, all three peptides have a ring structure of 17 amino acids with a disulphide bridge. However, the gene sequences coding for these peptides are different.

The ANP is mainly produced by atrial cardiomyocytes, while BNP is produced in large quantities in the ventricles. It is secreted rapidly in response to an increase in left ventricular end diastolic pressure and is associated with cardiac hypertrophy. The CNP is secreted by the endothelial cells. Unlike the precedent two peptides, plasma levels of the latter are lower. Once released into the circulation, ANP and BNP bind to the membrane receptors of the target tissue.

In HF, vasoconstriction and circulatory congestion mainly due to the renin angiotensin aldosterone system (RAAS) are frequently observed. BNP and ANP antagonize the action of angiotensin II. They reduce the levels of aldosterone which decrease the water-sodium retention and promote thereafter vasodilation [37].

Increased plasma levels of natriuretic peptides, especially BNP and its active metabolite NT-proBNP, has been reported in animal studies as well as in patients with heart failure [38]. In addition, other studies have shown an increase of tissue mRNA expression of genes coding to natriuretic peptides in the heart of patients and animals suffering from DD [39, 40]. BNP is used as a direct marker in the diagnosis of DD [41-44]. It is important to note that NT-proBNP and BNP plasma markers are increased in both forms of HF with higher values in HFrEF than in HFpEF [45, 46]. BNP values > 100 µg / mL or NT-proBNP > 300 µg / mL may be a sign of possible HF [47].

3. Adrenergic receptors:

Adrenergic receptors are cell surface receptors coupled to G proteins and are activated by their ligands, adrenaline or noradrenaline molecules. Divided into different types (α and β), these receptors have multiple roles and are located according to their types in several organs.

α -type receptors are divided into subtypes, α_1 and α_2 [48]. The α_1 are focalised at the postsynaptic level and their activation primarily causes vasoconstriction (increased blood pressure) and a pro-platelet aggregation response. The α_2 , meanwhile, is mainly found in the brain and allows activation of the G_i protein (inhibitor) that inhibits production of second messenger cAMP by inhibiting adenylate cyclase.

β -type receptors are divided into three subtypes: β_1 , β_2 and β_3 . The β_1 are mainly localized in heart and kidneys. Their stimulation causes a contraction of myocardial fibers and renin secretion. The β_2 receptors are found in coronary arteries and in smooth muscle cells of lung and uterus. Once activated, these receptors induce a relaxation of muscle fibers. The β_3 plays an important role in the relaxation of blood vessels, smooth muscle fibers of the uterus and bladder [49]. Therapeutically, more/less selective agents are used to block/stimulate certain types of adrenergic receptors. For example, in the case of DD, selective β_1 -blockers are used to reduce the heart rate and to decrease the secretion of renin. Also, it decreases the excitability and contractility of the myocardium. These drugs have shown a decrease in sudden death and cardiac events [50]. Unfortunately, organs often have more than one type of receptor which may increase the side effects of these agents.

4. Calcium homeostasis

Control of intracellular levels of calcium is crucial in muscle's contraction and relaxation processes. Cardiac performance depends on the ability of the myocardium to relax rapidly during diastole (to allow passive LV filling under low pressure) and to contract rapidly and sufficiently (to eject blood to the organs) during systole. Calcium status has been highly studied in the DD pathology [23]. We mention several main players of this metabolism like the SERCA2 pump (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump), its inhibitor phospholamban (PLB), the ryanodine receptor (RyR) and the sodium-calcium exchanger (NCX) [4]. During muscle contraction, calcium entry through voltage-gated L-type calcium channel stimulates the release of intracellular calcium stored in the sarcoplasmic reticulum (SR) by RyR. At the end of contraction,

cardiomyocytes enter a relaxation phase. A rapid cytosolic calcium sequestration happened by the capture of the latter via the SERCA2 pump and / or by its membrane exchanger (NCX) [51-53]. Several studies have shown a decrease in the expression of SERCA2a in the context of DD [54]. Phospholamban phosphorylates SERCA2 pump and inhibits its activity [55]. The role of this regulatory protein has been studied several times, and its activity was increased in subjects suffering from DD. PLB may be phosphorylated (inhibited) by protein kinase A and/or by calmodulin kinase (CAMK) [56]. Genetic therapies overexpressing SERCA2a or inhibiting PLB may be interesting therapeutic approaches against DD [57, 58].

The exchanger (NCX) is a membrane protein which pumps the cytosolic calcium out of the cell [59]. One cytosolic calcium ion is exchanged by entrance of three sodium ions inside of the cell [59]. NCX uses energy to perform its activity since the entrance of sodium is against its gradient of concentration in cells [60]. Studies showed an increase in exchanger's expression when a reduction of SERCA2 expression is noticed [61].

5. Fibrosis

Cardiac fibrosis has been directly linked to DD in several studies [24, 62]. Changes in the interstitial, vascular and perivascular fibrosis as well as collagen type I and III expression and their ratios were noticed in animals with DD [63]. Also, the increase of several genes linked to fibrosis, such as TGF- β 1 and CTGF, are reported [63, 64]. In addition, increase of fibrosis/collagen levels were correlated with LV stiffness [65]. Degradation of collagen by different strategies like plasmin, hydroxyproline and B-aminopropionitrile can improve ventricular stiffness [12]. Collagen fibres can decrease the elasticity of cardiomyocytes and subsequently alter their

contractile function [66]. Results concerning the structure and orientation of the collagen fibres have further validated the important involvement of fibrosis in the DD [67].

6. Oxidative stress

Oxidative stress is one of the important factors involved in the development of cardiovascular disease including DD [25]. Different studies showed an increase of reactive oxygen species (ROS) formation in DD context. Also, an increase in gene expression of the subunits of NADPH oxidase was observed [63]. Oxidative stress may increase the formation of interstitial fibrosis and reduces NO secretion by endothelial cells [68]. Studies have also shown a decrease of the expression of SERCA2a and a mitochondrial dysfunction due to oxidative stress [69]. Recently, increased oxidative stress and MR activation in the heart was linked to the development of LV remodelling and diastolic dysfunction in DS/obese rats [70].

7. Inflammation:

Inflammation is known to be the major contributor to the development of atherosclerosis and aortic valve stenosis [71, 72]. Nowadays, studies start to show an involvement of this inflammatory process in the DD [39]. Experimental studies of DD have shown an increase in mRNA levels of several inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 [39, 63]. In addition, the expression of the monocyte chemo-attractant molecule (MCP-1) and the quantity of macrophages are increased in rats with DD [63]. An increased presence of inflammatory and foam cells in the LV may have

a negative impact on the survival of cardiomyocytes and on the formation of myocardial injury [73].

Taken together, diastolic dysfunction (DD) is a complex disease which involves one or more pathways simultaneously. Animal models used to study the progression of DD are limited to few known models. Some risk factors such as aging, hypertension, obesity, diabetes and cardiac ischemia can contribute, alone or together, to the development of DD. We summarize in the following section of this review the main experimental models of DD. In addition, we present in Tables 1 and 2 these models accompanied by their strengths and weaknesses.

Animal models

1. Spontaneously hypertensive rats (SHR)

The SHR (spontaneously hypertensive rats) is the most used strain in investigations of CVD [74]. This model was discovered in the 1960s by Okamoto and colleagues. SHR rats develop high blood pressure (hypertension) spontaneously from the age of five to six weeks [75]. Several studies have shown that these rats develop DD which is mostly related to hypertension, and therefore, to cardiac hypertrophy [76]. Furthermore, elevations of inflammatory cytokines as well as natriuretic peptides have been reported in these rats [39]. Furthermore, another study showed that this strain would develop a DD even before suffering from hypertension (3 weeks old rats compared to Wistar rats) [77]. A new hypothesis emerged from these results indicating that the DD may be a predictor of hypertension. In addition, it demonstrates that the DD in SHR rats is not simply due to high blood pressure. It could be explained by another underlying mechanism which is not yet

understood. Finally, a recent report showed that levels of serum amyloid P-component (SAP) may be a suitable marker to identify patients with advancing DD. These authors have concluded that SAP may inhibit the recruitment of pro-fibrotic macrophages which prevents cardiac remodeling in SHR rats [78].

2. JCR rats: LA-Cp

Another model of rats with metabolic syndrome was recently shown as a new DD animal model [73]. The Cp gene (corpulent), which is autosomal recessive, was isolated by Koletsky in 1973 by crossing SHR rats with Sprague Dawley rats (SD). Homozygous rats for this muted gene (cp/cp) are obese, insulin resistant and develop hypertriglyceridemia. However, heterozygous (cp/+) or homozygous for the normal gene (+/+) are lean and metabolically normal [79]. Dr. Spencer's team showed an increase of the E / A ratio (> 2) and a decrease in isovolumic relaxation time (IVRT) parameters in JCR: LA-cp obese rats compared to control group. These echocardiographic data may refer to a moderate/severe form of DD due to decreased myocardial compliance. LV hypertrophy was observed and infusions of reconstituted HDL (rHDL) showed an improvement of diastolic function in this model [73].

3. Dahl salt-sensitive rats (DSS):

Developed by John Rapp around 1980s [80], this model develops hypertension (> 175 mmHg at the age of 9 weeks) and kidney failure when exposed to a high-salt diet [80]. DSS rats develop cardiac hypertrophy secondary to hypertension. This model has gained importance because it illustrates the slow transition from hypertrophy to DD. Studies have shown that these rats develop DD at the age of 19 weeks (12 weeks of high-salt diet). Indeed, an increase in the velocity of the

E wave and a reduction of the A wave of mitral flow were observed [81]. In other terms, the E/A ratio assessed by echocardiography, showed a significant increase at age of 19 weeks in DSS rats compared to the control group which present a restrictive pattern of DD.

4. DahlS.Z-lepr^{fa} / lepr^{fa} rats

In a model of metabolic syndrome, rats Dahl.Z-lepr^{fa}/lepr^{fa} showed cardiac remodeling and developed DD [63]. This strain comes from multiple crosses between Dahl rats salt-sensitive (Dahl Salt-sensitive) and "Zucker" rats carrying a homozygous mutation in the leptin receptor gene [82]. Leptin (also called appetite hormone) is a cytokine secreted by adipocytes (adipokines) [83]. Its main role is to decrease food intake by its binding to the its receptor expressed in the hypothalamus. A mutation in the gene coding to leptin receptor increases food intake and may induce insulin resistance as well as obesity [84]. Echocardiographic measurements, hemodynamic and molecular analysis were performed to validate the presence of DD in this new model [63]. Indeed, reduction in E/A transmitral flow ratio and delayed deceleration time of the E wave (DCT) and isovolumic relaxation time (IVRT) were observed in obese rats compared to control group. This is often encountered in a mild stage of DD indicating a ventricular relaxation problem. In addition, hypertension followed by cardiac hypertrophy was observed in this model. At the molecular level, an increase of interstitial and perivascular fibrosis and increased inflammation and oxidative stress were detected in obese rats when compared to control group. Finally, an increase of renin and angiotensin expression has been observed in these obese-hypertensive rats. The same group of researchers have reported similar results when applying oophorectomy to this rat model [85]. In addition, calorie restriction in this model has been proven to reduce DD development by reducing obesity, inflammation and oxidative stress [86]. In addition, treatment of obese rats with

pioglitazone showed an increase of obesity but an improvement of LV hypertrophy and DD by activating cardiac AMPK signalling pathway through to the stimulation of adiponectin secretion [87]. Finally, a recent report showed that blockade of glucocorticoid receptors (GR) with RU486 reduced LV fibrosis, cardiac oxidative stress as well as inflammation and DD. This molecule also reduced the adiposity and upregulated GR and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) expression in adipose tissue [88].

5. Hypertension caused by β -adrenergic agonists administration:

Chronic stimulation of cardiac β -adrenergic system may cause hypertrophy and fibrosis leading to DD [89]. Angiotensin II (Ang II) can activate the β -adrenergic signalling. Indeed, a subcutaneous injection of (Ang II) conducted over 14 days induced DD development in C57BL/6J mice [90]. DD was evidenced by a decrease of E/A ratio and an increase of E/Em ratio in response to Ang II compared to the control. These echocardiographic data were validated by a decrease of the pressure variation over time ($-dP/dt_{max}$) measured by catheterization. At the molecular level, hypertrophy, cardiac fibrosis and the natriuretic peptide levels were increased in treated group compared to control group [90]. Corroborating results were obtained in Sprague-Dawley rats as well as when using other molecules such as isoprenaline and phenylephrine. Also, Wistar rats developed hypertension after L-NAME administration. Indeed, higher blood pressure, higher (worsen) myocardial performance, fibrosis and elevated markers of oxidative stress (TBARS, LOOH) were observed in these rats. Sinapic acid (SA) was able to improve high blood pressure, myocardial and vascular dysfunction in these rats. In vitro study showed beneficial effect of SA on NO production by endothelial cells [91].

6. apoE^{-/-} mice:

The apoE^{-/-} mice present a deletion of the apoE gene and are therefore devoid of apolipoprotein E. ApoE is a structural component of VLDL and chylomicrons. It is responsible for the binding of these lipoproteins to LDL receptor mainly located on hepatocytes' membrane. The latter captures the lipid particles and prevents the accumulation of cholesterol in plasma. This model has mainly been used in studies of atherosclerosis. However, a recent study showed that these mice can develop a DD and a cardiac remodeling following their exposure to a diet rich in fat and fish oil (omega-3 fatty acids). Echocardiographic results showed cardiac hypertrophy in these mice, and increased B-type natriuretic peptide (BNP) [92].

7. Ldlr^{-/-} mice:

Ldlr^{-/-} mice have a mutation in the gene encoding for the LDL receptor (LDLr). Therefore, these mice do not express this LDLr, a receptor essential for the uptake of lipid particles containing apolipoprotein B or E as discussed above. It is a classic model of atherosclerosis. However, echocardiographic results obtained by our laboratory have shown that this model can also develop a DD after its exposure to western diet supplemented by vitamin D₂ (manuscript submitted). Indeed, transmitral E wave deceleration time as well as IVRT and left pulmonary S/D ratio were significantly altered after 20 weeks of diet when compared to control group. Also, an increase of LV hypertrophy as well as higher perivascular fibrosis was observed in these mice. Another report, showed ventricular hypertrophy and DD after ligation of the left coronary descending artery in Ldlr^{-/-} mice. In the same study, overexpression of apolipoprotein A-I leading to plasmatic HDL

cholesterol increase improved survival as well as remodeling and cardiac function [93]. Finally, combining a deficiency in leptin hormone to this $Ldlr^{-/-}$ mice model leads to DD development. Treatment with rosuvastatin improved DD in this model via the reduction of cardiac fibrosis [94].

8. The diabetic db / db mice:

db/db mice is a type II diabetes mouse model with a mutation in the gene encoding for the leptin receptor. It is considered a diabetic cardiomyopathy model. In fact, diabetes is one of the major risk factors of cardiovascular diseases. This model shows an insulin resistance in the early stages, progressing to a deficiency in the secretion of insulin. Its use for study of cardiovascular disease is very important especially because diabetes is a frequent metabolic syndrome which may be either independent of the presence of the coronary syndrome. At the age of 12 weeks, these mice showed the development of DD concomitant with systolic dysfunction (SD). These cardiac dysfunctions were improved by the overexpression of the human glucose transporter type 4 (hGLUT4) [95].

9. Models treated with streptozotocin (STZ):

Streptozotocin (STZ) is a chemical substance that induces diabetes by damaging the β cells of the islets of Langerhans in pancreas. These cells are responsible for insulin secretion. High doses of STZ causes β cells death and lead to type I diabetes. However, small and repeated doses can induce type II diabetes. Studies have shown that infusions of STZ to Wistar rats can lead to DD despite the absence of ventricular hypertrophy [96, 97]. Indeed, in the presence of normal blood pressure, the rats showed a decrease of the contractile function and relaxation of the isolated hearts of rats

STZ as measured by the Langendorff perfusion method. In another study, female Sprague Dawley rats showed higher IVRT and a decrease of the transmitral E/A ratio after STZ injection [98].

10. Surgical models in small and large species (TAC and MI)

Models of myocardial infarction (MI) and left ventricular hypertrophy (LVH) in association with DD have been reported in many studies [99-102]. Indeed, cardiac ischemia and ventricular hypertrophy are common causes for the development of DD. Firstly, the ligation of the coronary artery causes ischemia in heart. On the other hand, transverse aorta constriction (TAC) increases cardiac hypertrophy by increasing afterload. In fact, the diastolic pressure increases after application of the aortic ring, causing LVH and DD. Studies have shown a restrictive form of DD in this model of TAC. Using echocardiography, these animals show an increase of transmitral E wave velocity, a decrease of transmitral A wave velocity (ratio E/A increases), a shortening of the E wave deceleration time and a shortening of IVRT [103].

These same surgical models are often used in various types of relatively large animals (rabbit, pig, dog and sheep) [104]. Echocardiographic and hemodynamic measurements were done. A follow up from 1 to 24 months was made in different studies. Conclusions were concordant regarding the presence of LVH. However, hemodynamic data assessing the stiffness of the ventricle, like the increase in LVEDP for example, appear to be clearer in some studies than others [105-108]. Ishiwaka et al (2015), in a recent study, have showed an increase in LVH and increased ventricular stiffness in a pig model of severe aortic stenosis compared to normal pigs [109]. DD was developed in absence of SD. Cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis was demonstrated by histological analyses.

11. Hypercholesterolemic rabbits

Rabbits are considered as a medium size experimental model. Some studies have shown that rabbits exposed to an hypercholesterolemic diet may develop DD [54, 110]. DD related to relaxation disorders of the cardiomyocytes was demonstrated after 12 weeks of 0.5% cholesterol diet. Indeed, changes in the calcium pump SERCA2 expression and activity were seen in this model of DD [110]. Also, in 2006, a post-infarction study in rabbits showed an exaggeration of the progression of the DD following a high cholesterol diet. This DD was improved after treatment with simvastatin [111]. Indeed, dP/dt_{\max} was decreased more significantly (more severe DD) in the presence of the high cholesterol diet. In addition, obesity in rabbits lead to decrease of LV diastolic compliance [112]. Few years ago, our laboratory has demonstrated regression of aortic valve stenosis following infusions of HDL mimetic's peptide in a rabbit model exposed to a high cholesterol diet supplemented by vitamin D₂ [46]. In this same model, we recently observed an improvement of diastolic dysfunction after treatment by HDL mimetic peptide [113]. A second study was conducted by our team, but this time, using a heart rate reducer agent (Ivabradin) in a hypercholesterolemic rabbit model. Ivabradin improved diastolic function of these rabbits compared to placebo group [64]. In conclusion, many studies have shown that the hypercholesterolemic rabbit might develop DD and could be a suitable model to study effects of potential treatment of DD disease.

12. Wrapped kidney

This model is mainly used in studies on large animals (although also reported in mice). Renal dysfunction may contribute to the development of the DD. This model basically presents

hypertension which leads to DD. Indeed, dogs of different ages showed that wrapping of their kidneys by a piece of tissue (for one or both kidneys) could induce DD in these animals [114, 115]. Higher LVEDP was observed compared to normal group. However, LVEDV and ejection fraction were not significantly changed. The results observed by different researchers were not necessarily concomitant, except for hypertension and LV hypertrophy which were reported in almost all studies [104]. Changes in levels of Ang II, BNP and plasma renin activity were seen in some studies but not in others [114, 116].

13. Aging models

DD is known to progress with age in humans. Interestingly, women present a higher risk to develop this disease than men. DD has been studied in several models of aging in rats and mice [117]. For instance, aging rats (Fischer 344 strain) develop left ventricular hypertrophy and subsequent DD. In this study, DD was greater in females than in males [118]. Another aging mice model (SAMP8) was compared to mice resistant to aging (SAMR1) [119]. At the age of 6 months, the SAMP8 mice show decreased E/A and Em/Am ratios compared to the control group (SAMR1). These echocardiographic findings were also confirmed by invasive hemodynamic measurements [119]. Increased slope of the end-diastolic pressure-volume relationship (0.5 ± 0.05 vs. 0.8 ± 0.14 ; $P < 0.05$), indicating increased left ventricular chamber stiffness was present in aged mice compared to normal mice. However, systolic function and mean arterial pressure were not significantly altered between groups. Interstitial collagen area increased from 0.3 ± 0.04 to $0.8 \pm 0.09\%$ and perivascular collagen area increased from 1.0 ± 0.11 to $1.6 \pm 0.14\%$ in SAMR1 vs SAMP8 mice, respectively ($P < 0.05$) [119]. Other species were also described for DD development over time. Indeed, aged dogs (9.8 ± 0.8 years) were compared to younger ones (4.8 ± 0.4 years). Less

distensible LVs, with higher LVEDP and lower LVEDV were retrieved in these aged animals. However, heart rate, ejection fraction, blood pressure and LV weight remains unchanged between the groups [120].

Conclusion

DD is a complex disease which needs further study to be well understood. Patients suffering from this pathology have a poor prognosis which is similar to those suffering from systolic heart failure. Treatments of DD are lacking, and such research need to be invigorated. The selection of suitable animal model to assess treatment effects is primordial. In this review, we presented the most common animal models. Strengths and weaknesses of each one were described. Depending on the size of species, larger animals would probably better illustrate human pathophysiology. Moreover, some techniques would be easier to use (imaging, for example) in comparison of their application to assess DD in humans. Also, access to a better quantity of biological tissues, ex vivo, gives more opportunities to study the molecular mechanisms involved in the development of this disease. However, murine models (and tools such as antibodies) are more available and are much less expensive as well as easier to handle. Also, rodent models are more easily modified genetically, which give a high variety of models presenting DD. This aspect is very important, especially in DD which involves more than one underlying mechanisms. Indeed, hypertension, ischemia, diabetes, aging and other conditions can lead to DD development. We classified in tables 1 and 2 these models based on the species and on the aetiology behind the DD. We also summarized their common as well as specific strengths and weaknesses.

Imaging techniques are in continuous development and are very important to choose the best animal model of LVDD. As mentioned above, echocardiography remains the standard method of choice to assess the presence and the severity of the LVDD disease. However, like any other method, this technique has several limitations. First, DD is a complex condition to evaluate. Several factors can influence the results, such as age, abnormalities of the preload, afterload, the LV systolic function, valvular heart disease, heart rate and the presence of atrial arrhythmias. Also, it has subjective and technical aspects which make it sonographer's dependent. Finally, the presence of tachycardia or prolonged PR interval result in the fusion of E and A speeds, making difficult the calculation of the ratio E/A and E/Em [121].

Another component of DD assessment by ultrasound is the "strain" or "strain rate". This allows detecting the deformation or displacement of the myocardium [122]. It means, if different parts of the heart moves with different speeds, the latter will undergo deformation and will change shape. Thus, measurements of the movements of the wall cannot differentiate the active and passive movements of a segment of the myocardium, while the deformation analysis (strain and strain rate) allow discrimination between these types of motion of the myocardial tissue.

Table 1:

Species	Model	Common strengths of the species	Specific strengths of the model	Common weaknesses of the species	Specific weaknesses of the species
Mouse	MI	- Less expensive (price, housing ...)	- Ischemia isolated from other risk factors.	- Too small (less tissue, more difficult imaging techniques) - Different physiology compared to human (cardiac frequency, electrophysiological properties ...)	- More difficult to perform some procedures.
	TAC	- Well used and developed tools (antibodies, tests ...)	- DD without aortic valve stenosis or atherosclerosis.		- High risk of mortality after surgery.
	Modified genotype		- Identify specific molecular pathways.		- More follow up needed. - Some colonies difficult to obtain.
Rat	MI	- Less expensive.	- Ischemia isolated from other risk factors.	- Much lower number of available transgenic or knock out models than mice. - Results may not necessarily be reproduced in humans because of the difference in nature and physiology.	- More difficult to perform some procedures.
	TAC	- Very well developed.	- DD without aortic valve stenosis or atherosclerosis.		- High risk of mortality and variation after surgery.
	Modified genotype	- Bigger than mice (more tissues, imaging and surgical technique easier...)	- Identify specific molecular pathways.		- Tight follow up needed - Some colonies difficult to obtain.
Rabbit	Hyperchol	- Bigger than above species.	- No surgery needed - Progressive pathology	- More expensive than mouse and rat. - Less developed tools (antibodies, genome ...)	- Coexistence of multiple pathologies.
	MI	- Closer to human physiology.	- Ischemia isolated from other risk factors.		- Difficult procedures
	TAC	- Easy to manipulate - Very good echocardiographic image quality	- DD without aortic valve stenosis or atherosclerosis.		- High risk of mortality and variation after surgery. - More follow up needed.
Pig, dog, sheep	Renal wrapping	- Feasible technique - Physiology closer to human	- Kidney failure and hypertension.	- Very expensive. - Not a wide variety in strains and genetics.	- High risk of mortality after surgery.
	TAC	than murine models	- DD isolated from aortic valve stenosis and atherosclerosis		- A lot of variation between animals - Follow up needed.

Table 2:

Risk factor	Model	Strengths of the model	Weaknesses of the model
Hypertension	SHR rats	Progressive hypertension, good chronic model, available, no surgery is needed.	<ul style="list-style-type: none"> - Develops hypertension quickly. - More expensive than typical rats.
	Dahl-Salt Sensitive rats		
	Agonists of Ang II	Non-invasive model with good reproducibility.	<ul style="list-style-type: none"> - High mortality rate with high doses of agonists.
	TAC (mice, rats, rabbits, pig...)	LVDD due to pressure overload only.	<ul style="list-style-type: none"> - Surgery, exhaustive follow-up. - High variability.
Diabetes	db/db mice	Diabetes development similar to humans	<ul style="list-style-type: none"> - Only diabetes which is less pertinent in LVDD context.
	Streptozotocin	Can be combined easily with other risk factors.	<ul style="list-style-type: none"> - Carcinogenic (liver and kidney).
Metabolic syndrome (hypertension, diabetes and obesity)	JCR: LA-Cp rats	<ul style="list-style-type: none"> - Metabolic syndrome similar to human's. - More than one factor contributing to LVDD progression. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limited echocardiographic data - Difficulty to target one pathway.
	Dahl.S-Z(fa/fa) rats		<ul style="list-style-type: none"> - Obesity developed quickly, difficulty to manipulate. - Expensive, available only from Japan. Transport costs very high.
Dyslipidemia	ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} mice	<ul style="list-style-type: none"> - High levels of cholesterol. - No hypertension. - Echo data easy to acquire in rabbits - More biological material in rabbits 	<ul style="list-style-type: none"> - Develops skin lesions, difficult to manipulate. - Less material for ex vivo experiments.
	Hyperchol rabbits		<ul style="list-style-type: none"> - LVDD in presence of aortic valve stenosis and coronary artery disease. - Antibodies and genome not well developed and less characterized.
Aging	FVB mice and Fisher 344 rats	<ul style="list-style-type: none"> - Mime effects of age on LVDD as in humans. - Cardiac hypertrophy. 	<ul style="list-style-type: none"> - Slow, take near to one year to develop. - High risk of kidney disease development.

References

1. Murphy, S.W., *Diastolic Dysfunction*. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2004. **6**(1): p. 61-68.
2. Desai, A.S. and L.W. Stevenson, *Rehospitalization for heart failure: predict or prevent?* Circulation, 2012. **126**(4): p. 501-6.
3. Fukuta, H. and W.C. Little, *The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling*. Heart Fail Clin, 2008. **4**(1): p. 1-11.
4. Borlaug, B.A. and D.A. Kass, *Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure*. Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(8): p. 273-9.
5. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function*. Circulation, 2002. **105**(11): p. 1387-93.
6. Gaasch, W.H., *Diagnosis and treatment of heart failure based on left ventricular systolic or diastolic dysfunction*. JAMA, 1994. **271**(16): p. 1276-80.
7. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment*. Circulation, 2002. **105**(12): p. 1503-8.
8. Anthony Fauci, E.B., Denis Kasper, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Jameson, Joseph Loscalzo, *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 17th edition ed.: McGraw-Hill Professional.
9. Martos, R., et al., *Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction*. Circulation, 2007. **115**(7): p. 888-95.
10. Melendez, G.C., et al., *Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats*. Hypertension, 2010. **56**(2): p. 225-31.
11. Asher, C.R. and A.L. Klein, *Diastolic heart failure: restrictive cardiomyopathy, constrictive pericarditis, and cardiac tamponade: clinical and echocardiographic evaluation*. Cardiol Rev, 2002. **10**(4): p. 218-29.

12. Kass, D.A., J.G. Bronzwaer, and W.J. Paulus, *What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure?* Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1533-42.
13. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography.* Eur J Echocardiogr, 2009. **10**(2): p. 165-93.
14. Abraham, J. and T.P. Abraham, *The role of echocardiography in hemodynamic assessment in heart failure.* Heart Fail Clin, 2009. **5**(2): p. 191-208.
15. Kasner, M., et al., *Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study.* Circulation, 2007. **116**(6): p. 637-47.
16. Oh, J.K., et al., *Diastolic heart failure can be diagnosed by comprehensive two-dimensional and Doppler echocardiography.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(3): p. 500-6.
17. C.M, O., *Textbook of clinical Echocardiography.* Fourth edition ed. 2009: Saunders, Elsevier.
18. Mandinov, L., et al., *Diastolic heart failure.* Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 813-25.
19. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic.* JAMA, 2003. **289**(2): p. 194-202.
20. Zile, M.R., C.F. Baicu, and W.H. Gaasch, *Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle.* N Engl J Med, 2004. **350**(19): p. 1953-9.
21. Satpathy, C., et al., *Diagnosis and management of diastolic dysfunction and heart failure.* Am Fam Physician, 2006. **73**(5): p. 841-6.
22. Vasan, R.S., et al., *Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort.* J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(7): p. 1948-55.
23. Periasamy, M. and P.M. Janssen, *Molecular basis of diastolic dysfunction.* Heart Fail Clin, 2008. **4**(1): p. 13-21.
24. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction.* Herz, 2002. **27**(2): p. 92-8.

25. Dekleva, M., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction is related to oxidative stress and exercise capacity in hypertensive patients with preserved systolic function.* Cardiology, 2007. **108**(1): p. 62-70.
26. Kai, H., et al., *Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis.* Hypertens Res, 2005. **28**(6): p. 483-90.
27. Mosterd, A., et al., *Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989.* N Engl J Med, 1999. **340**(16): p. 1221-7.
28. Zaman, M.A., S. Oparil, and D.A. Calhoun, *Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(8): p. 621-36.
29. Brilla, C.G., *Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis.* Cardiovasc Res, 2000. **47**(1): p. 1-3.
30. Brilla, C.G., *Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure.* Herz, 2000. **25**(3): p. 299-306.
31. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.* Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
32. Huraux, C., et al., *Superoxide production, risk factors, and endothelium-dependent relaxations in human internal mammary arteries.* Circulation, 1999. **99**(1): p. 53-9.
33. Burnett, J.C., Jr., et al., *Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human.* Science, 1986. **231**(4742): p. 1145-7.
34. Harrison, A., et al., *B-type natriuretic peptide predicts future cardiac events in patients presenting to the emergency department with dyspnea.* Ann Emerg Med, 2002. **39**(2): p. 131-8.
35. Chen, H.H. and J.C. Burnett, Jr., *The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials.* Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 406-16.
36. Chen, H.H. and J.C. Burnett, *Natriuretic peptides in the pathophysiology of congestive heart failure.* Curr Cardiol Rep, 2000. **2**(3): p. 198-205.
37. Levin, E.R., D.G. Gardner, and W.K. Samson, *Natriuretic peptides.* N Engl J Med, 1998. **339**(5): p. 321-8.
38. Lubien, E., *Utility of B-Natriuretic Peptide in Detecting Diastolic Dysfunction: Comparison With Doppler Velocity Recordings.* Circulation, 2002. **105**(5): p. 595-601.

39. Haugen, E., et al., *Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats.* Int J Cardiol, 2007. **115**(1): p. 24-8.
40. Luchner, A., et al., *Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction.* Cardiovasc Res, 2001. **51**(3): p. 601-7.
41. Mir, T.S., et al., *Plasma concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in control children from the neonatal to adolescent period and in children with congestive heart failure.* Pediatrics, 2002. **110**(6): p. e76.
42. Gardner, R.S., et al., *N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure.* Eur Heart J, 2003. **24**(19): p. 1735-43.
43. Jourdain, P., et al., *Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study.* J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(16): p. 1733-9.
44. Mueller, C., et al., *The integration of BNP and NT-proBNP into clinical medicine.* Swiss Med Wkly, 2007. **137**(1-2): p. 4-12.
45. Maisel, A.S., et al., *Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(11): p. 2010-7.
46. van Veldhuisen, D.J., et al., *B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction.* J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(14): p. 1498-506.
47. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
48. Bylund, D.B., *Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors.* FASEB J, 1992. **6**(3): p. 832-9.
49. Vrydag, W. and M.C. Michel, *Tools to study beta3-adrenoceptors.* Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2007. **374**(5-6): p. 385-98.

50. Brophy, J.M., L. Joseph, and J.L. Rouleau, *Beta-blockers in congestive heart failure. A Bayesian meta-analysis*. Ann Intern Med, 2001. **134**(7): p. 550-60.
51. Fabiato, A., *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol, 1983. **245**(1): p. C1-14.
52. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
53. Lederer, W.J., et al., *Excitation-contraction coupling in heart cells. Roles of the sodium-calcium exchange, the calcium current, and the sarcoplasmic reticulum*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **588**: p. 190-206.
54. Huang, Y., et al., *Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 97-102.
55. Frank, K.F., et al., *Modulation of SERCA: implications for the failing human heart*. Basic Res Cardiol, 2002. **97 Suppl 1**: p. I72-8.
56. Simmerman, H.K. and L.R. Jones, *Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function*. Physiol Rev, 1998. **78**(4): p. 921-47.
57. del Monte, F., et al., *Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 904-7.
58. Miyamoto, M.I., et al., *Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 793-8.
59. Hinata, M., et al., *Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes*. J Physiol, 2002. **545**(Pt 2): p. 453-61.
60. DiPolo, R. and L. Beauge, *Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 155-203.
61. Hasenfuss, G., et al., *Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium*. Circulation, 1999. **99**(5): p. 641-8.
62. Pawlinski, R., et al., *Tissue factor deficiency causes cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15333-8.
63. Murase, T., et al., *Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome*. Hypertens Res, 2012. **35**(2): p. 186-93.

64. Busseuil, D., et al., *Heart rate reduction by ivabradine reduces diastolic dysfunction and cardiac fibrosis*. *Cardiology*, 2010. **117**(3): p. 234-42.
65. Yamamoto, K., et al., *Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart*. *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(1): p. 76-82.
66. Badenhorst, D., et al., *Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats*. *Cardiovasc Res*, 2003. **57**(3): p. 632-41.
67. Norton, G.R., et al., *Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats*. *Circulation*, 1997. **96**(6): p. 1991-8.
68. Ma, L., et al., *Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the transgenic (mRen2) rat*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(11): p. H2341-51.
69. Diaz-Munoz, M., et al., *Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction*. *Mol Cell Biochem*, 2006. **289**(1-2): p. 125-36.
70. Takahashi, K., et al., *Roles of oxidative stress and the mineralocorticoid receptor in cardiac pathology in a rat model of metabolic syndrome*. *Nagoya J Med Sci*, 2015. **77**(1-2): p. 275-89.
71. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
72. Helske, S., et al., *Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(5): p. 483-91.
73. Borthwick, F., et al., *ApoA-I infusion reduces arterial cholesterol and myocardial lesions in a rat model of cardiac dysfunction and insulin resistance*. *Atherosclerosis*, 2012. **222**(2): p. 402-8.
74. Knardahl, S. and E.D. Hendley, *Association between cardiovascular reactivity to stress and hypertension or behavior*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(1 Pt 2): p. H248-57.

75. Vaziri, N.D., Z. Ni, and F. Oveisi, *Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1998. **31**(6): p. 1248-54.
76. Slama, M., et al., *Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H181-5.
77. Dupont, S., et al., *The onset of left ventricular diastolic dysfunction in SHR rats is not related to hypertrophy or hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(7): p. H1524-32.
78. Horgan, S.J., et al., *Serum Amyloid P-Component Prevents Cardiac Remodeling in Hypertensive Heart Disease*. J Cardiovasc Transl Res, 2015. **8**(9): p. 554-66.
79. *Animal models of Diabetes : Frontiers in Research*. Second ed. 2007: Taylor&Francis Group.
80. Rapp, J.P. and H. Dene, *Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats*. Hypertension, 1985. **7**(3 Pt 1): p. 340-9.
81. Doi, R., et al., *Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats*. J Hypertens, 2000. **18**(1): p. 111-20.
82. Hattori, T., et al., *Characterization of a new animal model of metabolic syndrome: the DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rat*. Nutr Diabetes, 2011. **1**: p. e1.
83. Brennan, A.M. and C.S. Mantzoros, *Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. **2**(6): p. 318-27.
84. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
85. Murase, T., et al., *Effects of estrogen on cardiovascular injury in ovariectomized female DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats as a new animal model of metabolic syndrome*. Hypertension, 2012. **59**(3): p. 694-704.
86. Takatsu, M., et al., *Calorie restriction attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in a rat model of metabolic syndrome*. Hypertension, 2013. **62**(5): p. 957-65.

87. Matsuura, N., et al., *Effects of pioglitazone on cardiac and adipose tissue pathology in rats with metabolic syndrome*. Int J Cardiol, 2015. **179**: p. 360-9.
88. Takeshita, Y., et al., *Blockade of glucocorticoid receptors with RU486 attenuates cardiac damage and adipose tissue inflammation in a rat model of metabolic syndrome*. Hypertens Res, 2015. **38**(11): p. 741-50.
89. Lefkowitz, R.J., H.A. Rockman, and W.J. Koch, *Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure*. Circulation, 2000. **101**(14): p. 1634-7.
90. Mori, J., et al., *Agonist-induced hypertrophy and diastolic dysfunction are associated with selective reduction in glucose oxidation: a metabolic contribution to heart failure with normal ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2012. **5**(4): p. 493-503.
91. Silambarasan, T., et al., *Sinaptic acid prevents hypertension and cardiovascular remodeling in pharmacological model of nitric oxide inhibited rats*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115682.
92. Cleverley, K., et al., *The effects of fish oil consumption on cardiovascular remodeling in ApoE deficient mice*. Can J Physiol Pharmacol, 2013. **91**(11): p. 960-5.
93. Gordts, S.C., et al., *Beneficial effects of selective HDL-raising gene transfer on survival, cardiac remodelling and cardiac function after myocardial infarction in mice*. Gene Ther, 2013. **20**(11): p. 1053-61.
94. Hermida, N., et al., *HMGCoA reductase inhibition reverses myocardial fibrosis and diastolic dysfunction through AMP-activated protein kinase activation in a mouse model of metabolic syndrome*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(1): p. 44-54.
95. Semeniuk, L.M., A.J. Kryski, and D.L. Severson, *Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H976-82.
96. Wei, M., et al., *The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes*. Heart Lung Circ, 2003. **12**(1): p. 44-50.
97. Vadlamudi, R.V., R.L. Rodgers, and J.H. McNeill, *The effect of chronic alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance*. Can J Physiol Pharmacol, 1982. **60**(7): p. 902-11.

98. Joffe, II, et al., *Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(7): p. 2111-9.
99. Zolotareva, A.G. and M.E. Kogan, *Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice*. Cor Vasa, 1978. **20**(4): p. 308-14.
100. Bialik, S., et al., *Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53*. J Clin Invest, 1997. **100**(6): p. 1363-72.
101. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.
102. Patten, R.D., et al., *17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload*. J Card Fail, 2008. **14**(3): p. 245-53.
103. Litwin, S.E., et al., *Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure*. Circulation, 1995. **91**(10): p. 2642-54.
104. Dubi, S. and Y. Arbel, *Large animal models for diastolic dysfunction and diastolic heart failure-a review of the literature*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(3): p. 147-52.
105. Aoyagi, T., et al., *Myocardial function in immature and mature sheep with pressure-overload hypertrophy*. Am J Physiol, 1992. **262**(4 Pt 2): p. H1036-48.
106. Schubert, A., et al., *Extracellular matrix gene expression correlates to left ventricular mass index after surgical induction of left ventricular hypertrophy*. Basic Res Cardiol, 2001. **96**(4): p. 381-7.
107. Ye, Y., et al., *High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1570-6.
108. Malo, O., et al., *Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **42**(2): p. 275-86.

109. Ishikawa, K., et al., *Increased stiffness is the major early abnormality in a pig model of severe aortic stenosis and predisposes to congestive heart failure in the absence of systolic dysfunction*. J Am Heart Assoc, 2015. **4**(5).
110. Luo, T.Y., et al., *Effect of hypercholesterolemia on myocardial function in New Zealand white rabbits*. J Biomed Sci, 2004. **11**(6): p. 829-37.
111. Bauersachs, J., et al., *Simvastatin improves left ventricular function after myocardial infarction in hypercholesterolemic rabbits by anti-inflammatory effects*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(3): p. 438-46.
112. Carroll, J.F., et al., *Diastolic compliance is reduced in obese rabbits*. Hypertension, 1999. **33**(3): p. 811-5.
113. Merlet, N., et al., *HDL mimetic peptide CER-522 treatment regresses left ventricular diastolic dysfunction in cholesterol-fed rabbits*. Int J Cardiol, 2016. **215**: p. 364-371.
114. Hart, C.Y., et al., *Load versus humoral activation in the genesis of early hypertensive heart disease*. Circulation, 2001. **104**(2): p. 215-20.
115. Hayashida, W., et al., *Load-sensitive diastolic relaxation in hypertrophied left ventricles*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 2): p. H609-15.
116. Maniu, C.V., D.M. Meyer, and M.M. Redfield, *Hemodynamic and humoral effects of vasopectidase inhibition in canine hypertension*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 528-34.
117. Koch, S.E., et al., *Age- and gender-related changes in ventricular performance in wild-type FVB/N mice as evaluated by conventional and vector velocity echocardiography imaging: a retrospective study*. Ultrasound Med Biol, 2013. **39**(11): p. 2034-43.
118. Forman, D.E., et al., *Cardiac morphology and function in senescent rats: gender-related differences*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(7): p. 1872-7.
119. Reed, A.L., et al., *Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H824-31.
120. Asif, M., et al., *An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2809-13.

121. Appleton, C.P., *Influence of incremental changes in heart rate on mitral flow velocity: assessment in lightly sedated, conscious dogs*. J Am Coll Cardiol, 1991. **17**(1): p. 227-36.
122. Dandel, M., et al., *Strain and strain rate imaging by echocardiography - basic concepts and clinical applicability*. Curr Cardiol Rev, 2009. **5**(2): p. 133-48.